

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

**Quantificação de Resíduos de Amoxicilina e Ampicilina por Injeção
Direta de Amostras de Leite de Bovino**

Franciane Moura

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

Orientadora: Quezia B. Cass

***bolsista: CNPq**

São Carlos – SP

2011

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

M929qr Moura, Franciane.
Quantificação de resíduos de amoxicilina e ampicilina por
injeção direta de amostras de leite de bovino / Franciane
Moura. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
111 f.

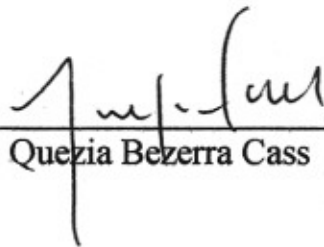
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2011.

1. Química analítica. 2. Leite. 3. Ampicilina. 4.
Cromatografia líquida de alta eficiência. 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

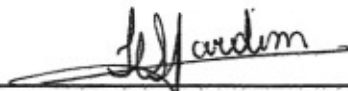
Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado acadêmico da candidata Franciane Moura, realizada em 07 de dezembro de 2011:



Prof. Dra. Quezia Bezerra Cass



Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso



Prof. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Para ser grande, sê inteiro:

Nada teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa.

Põe quanto és

No mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda

Brilha, porque alta vive

Fernando Pessoa

Dedico esta dissertação...

*Aos meus pais Vânia e Francisco e ao meu irmão Bruno por todo
amor dedicado e por me ajudar a tornar este sonho possível,*

Agradecimentos

À profa. Dra. Quezia Cass pela orientação, incentivo, dedicação e paciência demonstrado durante todo o desenvolvimento do trabalho e pela preocupação em me encaminhar profissionalmente após o mestrado.

Às professoras Dra. Regina V. Oliveira e Dra. Neila M. Cassiano pelas produtivas discussões, amizades e incentivo.

Ao Alexandre A. Cruz pela amizade e disposição em ajudar.

A todos os meus amigos do Grupo de Síntese Orgânica e CLAE: Marcela, Garça, Taciane, Juliana, Bianca, Thais, Kenia, Roberta, Marinão, Ricardo, Pedro Henrique, Tiago, Fernando, Vinicius, Paulo e Bruna. Agradeço pela amizade, happy hours, companherismo e por alegrarem meus dias.

A empresa EMS na figura da Dra Ângela C de Pietro por ceder os padrões dos compostos utilizados neste trabalho e a Embrapa na figura da Dra Ana Rita de Araujo Nogueira pelas amostras de leite bovino.

Aos meus pais José Francisco e Vânia e ao meu irmão Bruno pelo amor e por nunca desistirem de mostrar o caminho correto. A minha tia Valê por sempre estar presente em todos os momentos da minha vida.

Ao presente concedido: a amizade da Marcela e do Vinicius. Mesmo com o tempo e a distância, sempre presentes. Vão estar sempre em meu coração e pensamento.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

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

SUMÁRIO

Introdução	2
1.1 - O leite	2
1.1.1 - Mastite	5
1.2 - Antibióticos na medicina veterinária.....	7
1.2.1 - Antibióticos.....	9
1.2.1.1 - Antibióticos β lactâmicos	11
1.2.2 - Métodos empregados para a determinação de antibióticos β -lactâmicos..	13
1.3 - Preparo de amostras	15
1.3.1 - Preparo de Amostras <i>on line</i>	18
1.4 - Espectrometria de Massas.....	21
1.4.1 - Fonte de Ionização	21
1.4.2 - Analisadores	23
1.5 - Ultra-high pressure liquid chromatography (UHPLC).....	25
Objetivos	33
Procedimento Experimental	35
3.1 - Generalidades.....	35
3.2 - Preparo das Colunas de Proteína Imobilizada.....	36
3.2.1- Sílicas Utilizadas.....	36
3.2.2 - Colunas Analíticas Utilizadas	36
3.2.3 - Preparo das colunas RAM	37
3.3 - Determinação da exclusão de Proteínas pelas colunas RAM preparadas pelo método de Bradford	37
3.4 - Desenvolvimento dos métodos analíticos.....	38
3.4.1 - Parâmetros analíticos adotados para a validação de fármacos em matrizes biológicas	41
3.4.1.1 - Seletividade	41

3.4.1.2 – Linearidade	41
3.4.1.3 - Precisão e Exatidão	41
3.4.1.4 - Recuperação.....	41
3.4.1.5 - Limite de Quantificação (LQ) e de Detecção (LD)	42
3.4.1.6.- Estabilidade	42
a) Estabilidade das amostras após ciclos de gelo e degelo	42
b) Estudos do efeito de matriz	42
Resultados e Discussão	44
4.1 - Avaliação da Eficiência das Colunas RAM quanto a Exclusão das Proteínas do Leite Bovino	44
4.2 - Avaliação da Capacidade de Retenção dos Antibióticos pelas Colunas RAM-BSA de Troca Catiônica.....	49
4.3 - Avaliação da Capacidade de Retenção dos Antibióticos pelas Colunas RAM de fase hidrofóbicas.....	57
4.3.1 - Desenvolvimento do método LC-LC/UV-vis para a quantificação dos fármacos amoxicilina e ampicilina em leite bovino.....	61
4.3.2 - Avaliação da Capacidade de Retenção dos Antibióticos pelas Colunas RAM - β – lactoglobulina.....	65
4.4 - Desenvolvimento do método LC-UHPLC-MS/MS para os fármacos amoxicilina e ampicilina.	72
4.4.1 - Efeito de matriz	82
4.4.2 - Validação do método UHPLC-LC-MS/MS para a determinação de ampicilina em leite bovino.....	89
5 - Conclusão	94
6 - Referências Bibliográficas.....	97

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
APCI	Ionização Química a Pressão Atmosférica
API	Ionização a pressão atmosférica
BSA	Albumina Sérica Bovina
CE	Eletroforese Capilar
CID	Fragmentação por Colisão Induzida
DC	Corrente Direta
DLLE	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva
ESI	Ionização por eletrospray
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HF-LPME	Microextração em Fase Líquida com Fibra Oca
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida Acoplada a um Detector de Arranjo de Diodos
HSA	Albumina Sérica Humana
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISSO	Isopropanol
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 Sequencial
LLE	Extração Líquido-Líquido
LPME	Microextração em Fase Líquida

m/z	Razão Massa/Carga
ME	Efeito de Matriz
MeOH	Metanol
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
MS	Espectrômetro de massas
PNCR	Programa Nacional de Controle de Resíduos
RAM	Fase de Acesso Restrito
RAM-BSA	Fase RAM BSA-Imobilizada
RAM-BSA C ₈	Fase RAM tipo Octadecil-Sílica BSA-Imobilizada
RAM-BSA SAX	Fase RAM tipo Troca Aniônica Forte-Sílica BSA-Imobilizada
RAM-BSA SCX	Fase RAM tipo Troca Catiônica Forte-Sílica BSA-Imobilizada
RF	Corrente alternada
SAX	Trocador Aniônico Forte
SCX	Trocador Catiônico Forte
SDME	Microextração em Gota Suspensa
SPME	Microextração em Fase Sólida
UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
UV-vis	Ultra-violeta visível
WAX	Trocador Aniônico Fraco
WCX	Trocador Catiônico Fraco

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Composição média das substâncias presentes no leite bovino ¹	2
Tabela 1.2: Composição aproximada do leite bovino, humano, caprino e ovino ²	3
Tabela 1.3: Principais países produtores de leite no mundo – 2009	4
Tabela 1.4: Perdas estimadas devido à mastite bovina	6
Tabela 1.5: Alteração na composição do leite devido à mastite. Quantidades médias (g/100g) encontradas no leite normal e leite mastítico ¹⁵	7
Tabela 1.6: Nível máximo de resíduo permitido para antibióticos em leite	9
Tabela 1.7: Desvantagens oferecidas pelas técnicas de pré-tratamento de amostras mais usuais	16
Tabela 1.8: Limite de quantificação encontrado para antibióticos em leite	30
Tabela 4.1: Avaliação da eficiência de exclusão protéica em colunas RAM-BSA SACX com diferentes volumes de reagente colorimétrico	49
Tabela 4.2: Influência da concentração de formiato de sódio utilizado como fase móvel no fator de retenção (k) dos analitos	56
Tabela 4.3: Condições utilizadas no acoplamento das colunas RAM-BSA C ₈ (50 × 4,6mm Luna-Phenomenex [®] , 10 μm e 100 Å) e analítica C ₁₈ (150 × 4,6 mm Luna-Phenomenex [®] , 10 μm e 100 Å), para análise de amoxicilina e ampicilina em leite bovino.....	64
Tabela 4.4: Quantidade relativa das principais proteínas do soro do leite	67
Tabela 4.5: Condições utilizadas no acoplamento das colunas RAM-βLG C ₈ (50 × 4,6 mm Luna-Phenomenex [®] , 10 μm e 100 Å) e analítica C ₁₈ (150 × 4,6 mm Luna-Phenomenex [®] , 10 μm e 100 Å), para análise de amoxicilina e ampicilina em leite bovino.....	69
Tabela 4.6: Condições de fragmentação para ampicilina.....	75
Tabela 4.7: Condições utilizadas no acoplamento das colunas RAM-BSA C ₈ (50 × 2,1mm Luna-Phenomenex [®] , 10 μm e 100 Å) e analítica ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ (50 × 2,1mm 1,7μm), para análise de ampicilina em leite bovino.....	78
Tabela 4.8: Condições utilizadas no acoplamento das colunas RAM-BSA C ₈ (50 × 2,1 mm Luna-Phenomenex [®] , 10 μm e 100 Å) e analítica ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ (50 × 2,1mm 1,7μm), para análise de ampicilina em leite bovino.....	81

Tabela 4.9: Valores de efeito de matriz em leite bovino desnatado para análise de ampicilina pelo modo de extração <i>on-line</i> 2D.....	85
Tabela 4.10: Valores de efeito de matriz em leite bovino desnatado e in natura para análise de ampicilina pelo modo de extração <i>on-line</i> 2D	88
Tabela 4.11: Precisão (CV%) e exatidão interdias e intradias do método desenvolvido	90
Tabela 4.12: Eficiência de extração obtida para as amostras de controle de qualidade.....	91
Tabela 4.13: Precisão e exatidão obtidas para a ampicilina no teste cego	91

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Representação esquemática dos principais constituintes do leite. Adaptado da referência ¹	3
Figura 1.2: Percentual da produção dos principais estados produtores de leite. Fonte: IBGE – Pesquisa da Pecuária Municipal. Elaboração: Laboratório de Geoprocessamento Embrapa Gado de Leite.	5
Figura 1.3: Mecanismo de ação dos antibióticos. Adaptado da referência ²⁴	10
Figura 1.4: Formação da ligação cruzada para a construção da parede celular de bactérias ²⁶	11
Figura 1.5: Representação estrutural dos antibióticos β lactâmicos e cefalosporínicos	12
Figura 1.6: Mecanismo de ação normal e mecanismo inibido pela molécula de penicilina ²⁶	12
Figura 1.7: Esquema do mecanismo proposto para a exclusão de macromoléculas ⁸²	20
Figura 1.8: Esquema de formação do electrospray no modo positivo. Adaptado da referência ¹⁰⁷	22
Figura 1.9: Feixe de íons em um analisador quadrupolar. Adaptado da referência ¹¹²	24
Figura 1.10: Esquema de funcionamento de um equipamento com dois analisadores quadrupolares em tandem. Adaptado da referência ¹¹³	25
Figura 1.11 Representação esquemática dos volumes de injeção em coluna de HPLC e UPLC	28
Figura 1.12: Gradiente utilizado para a separação de folatos: a) HPLC, 23 ⁰ C, vazão 0,4 mL.min ⁻¹ b) UHPLC, 30 ⁰ C, vazão 0,5 mL.min ⁻¹ c) UHPLC, 60 ⁰ C, vazão 0,7 mL.min ⁻¹ ¹¹⁷	29
Figura 4.1: Representação esquemática das diferentes colunas de meio de acesso restrito utilizadas neste trabalho	44
Figura 4.2 Esquema representativo das etapas envolvidas no preparo das colunas RAM ¹³⁴	45
Figura 4.3: Procedimento utilizado para avaliar a eficiência de exclusão protéica pelas colunas RAM. Adaptado da referência ¹³⁴	46

Figura 4.4: Espectros de UV-Vis correspondentes ao complexo proteína-corante da primeira fração (2mL) de leite bovino eluido pela coluna RAM β -lactoglobulina C ₈ (50 × 4,6mm; 100 Å, 10mm) para os volumes de 50, 100 e 200 μ L.....	47
Figura 4.5: Porcentagem de proteínas excluídas pelas colunas RAM (a) BSA SCX (b) BSA SAX (c) BSA C ₈ (d) β -lactoglobulina C ₈ (e) MAYIC8 Shimadzu.....	48
Figura 4.6: Representação do processo de troca catiônica que requer a competição entre o contra-íon e os íons presentes na amostra pelos sítios carregados da fase estacionária.....	50
Figura 4.7: Representação estrutural dos antibióticos β -lactâmicos, amoxicilina e ampicilina	52
Figura 4.8: Fase trocadora de cátions recoberta com albumina sérica bovina	53
Figura 4.9: Cromatogramas referentes a injeção de amoxicilina 100 μ g/mL. Utilizando com fase móvel ácido fórmico (A) 2,5 mM (B) 50 mM a um vazão de 1 mL/min. Temperatura de 30°C. Comprimento de onda de 230 nm. Coluna SCX Nucleosil (100-S 5A 50X4,6; 5 μ m).....	54
Figura 4.10: Equilíbrio químico para a amoxicilina em condições ácidas.....	54
Figura 4.11: Cromatogramas referentes a injeção de amoxicilina 100 μ g/mL. Utilizando com fase móvel formiato de sódio através da variação de (A) pH (B) concentração, a um vazão de 1 mL/min. Temperatura de 30°C. Comprimento de onda de 230 nm. Coluna SCX Nucleosil (100-S 5A 50X4,6; 5mm).....	55
Figura 4.12: Capacidade de retenção dos trocadores catiônicos frente aos analitos amoxicilina e ampicilina variando os valores de pH do formiato de sódio utilizado como fase móvel.	56
Figura 4.13: Esquema do mecanismo proposto para a exclusão de macromoléculas para a coluna MAYI-ODS ¹⁴⁸	58
Figura 4.14: Cromatogramas de amostra de ampicilina (50 μ g/mL) em solução aquosa utilizando RAM MAYI C ₈ . Condições cromatográficas: Fase móvel: Acetato de amônia 10 mM; vazão 1mL/min; volume de injeção 100 μ L. Detecção UV 230 nm.	59
Figura 4.15: Cromatogramas de amostras de (A) Amoxicilina (B) Ampicilina a (50 μ g/mL) em solução aquosa utilizando RAM MAYI C ₈ . Condições cromatográficas: Fase móvel: Formiato de amônia 10 mM; vazão 1mL/min; volume de injeção 100 μ L. Detecção UV 230 nm.	59
Figura 4.16: Cromatogramas referentes a amostras de leite e leite dopado com AMO e AMP (50 μ g/mL) utilizando (A) RAM BSA C ₈ e (B) RAM MAYI C ₈ . Vazão: 1mL/min; volume de injeção 100 μ L. Detecção UV 230 nm.	60

Figura 4.17: Diagrama do sistema multidimensional utilizado para o desenvolvimento do método. Posição 1: coluna RAM e coluna analítica desacopladas; Posição 2: Colunas RAM e analítica acopladas (transferência dos analitos).....	62
Figura 4.18: Cromatogramas referentes as amostras de leite e leite dopado com amoxicilina e ampicilina, em (A) 1D (B) 2D, na concentração de 100 µg/mL a uma vazão de 1 mL/min. Temperatura de 30 ⁰ C. Comprimento de onda de 230 nm. Colunas: RAM-BSA C ₈ (50 × 4,6 mm Luna-Phenomenex [®] , 10 µm e 100 Å) e analítica C ₁₈ (150 × 4,6 mm Luna-Phenomenex [®] , 10 µm e 100 Å).	63
Figura 4.19: Curva de calibração para a amoxicilina (A) e ampicilina (B) em leite....	65
Figura 4.20: Seqüência de reações para o intercruzamento da BSA e redução das bases de Schiff e aldeídos residuais.	68
Figura 4.21: Representação estrutural da βLG e BSA, em destaque os resíduos de lisina na superfície das proteínas	68
Figura 4.22: Cromatograma da análise de leite fortificado com amoxicilina e ampicilina (20 µg/mL), com acoplamento das colunas RAM-βLG C ₈ (50 × 4,6mm Luna-Phenomenex [®] , 10 µm e 100 Å) e analítica C ₁₈ (150 × 4,6 mm Luna-Phenomenex [®] , 10 µm e 100 Å). Condições cromatográficas descritas na tabela 12.	70
Figura 4.23: Cromatogramas referentes a injeção de padrão de amoxicilina e ampicilina em água na coluna RAM-βLG C ₈ (50 × 4,6mm Luna-Phenomenex [®] , 10 µm e 100 Å). (A) 30 dias (B) 60 dias e (C) 75 dias após o preparo da coluna.	71
Figura 4.24: Número de artigos publicados desde o ano de 2003 até junho de 2011. Barras pretas usando como palavra chave UHPLC ou UPLC e em branco utilizando como filtro MS.Base de dados: Scopus.....	73
Figura 4.25: Espectro de massas obtido pela infusão da amoxicilina em tampão formiato de amônia.....	74
Figura 4.26: Espectro de massas, no modo SRM (<i>single reaction monitoring</i>), referente ao íon molecular (A) e íons fragmentos (B) da ampicilina.....	76
Figura 4.27: Diagrama do sistema multidimensional utilizado para o desenvolvimento e validação do método para quantificação de ampicilina em leite.....	77
Figura 4.28: Cromatogramas referentes a injeção de amostra de leite e leite dopado com ampicilina na concentração de 10 ng/mL no modo (A) 1D e (B) 2D. Colunas: RAM-BSA C ₈ (50 × 4,6 mm Luna-Phenomenex [®] , 10 µm e 100 Å) e analítica ACQUITY BEH C ₁₈ (50 × 2,1 mm, 1,7 µm).Volume de injeção 10 µL. Vazão 0,4 mL/min em ambas as colunas, T=30 ⁰ C coluna analítica.....	79

Figura 4.29: Comparação entre as larguras das bandas cromatográficas em (A) coluna RAM BSA C ₈ (50 × 4,6 mm Luna-Phenomenex®, 10 μm e 100 Å) (B) coluna ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ (50 × 2,1 mm, 1,7 μm) (C) método acoplado.....	80
Figura 4.30: Cromatogramas referentes a injeção de amostra de leite e leite dopado com ampicilina na concentração de 10 ng/mL no modo (A) 1D e (B) 2D. Colunas: RAM-BSA C8 (50 × 4,6 mm Luna-Phenomenex®, 10 μm e 100 Å) e analítica ACQUITY BEH C18 (50 × 2,1 mm, 1,7 μm). Volume de injeção 10 mL. Vazão 0,4 mL/min em ambas as colunas, T=300C coluna analítica.	82
Figura 4.31: Figura adaptada da referência ¹⁹⁴ . Esquema dos dois métodos utilizados para avaliação do efeito de matriz (A) método de infusão pós coluna (B) método de extração <i>on line</i>	84
Figura 4.32: Cromatograma da amostra de ampicilina em leite bovino in natura após acoplamento.....	87
Figura 4.33: Infusão direta pós coluna de padrão de ampicilina, após a injeção de leite bovino no sistema multidimensional.	88
Figura 4.34: Curva analítica para a ampicilina	89

RESUMO

RESUMO

Quantificação de Resíduos de Amoxicilina e Ampicilina por Injeção Direta de Amostras de Leite de Bovino

O desenvolvimento de novos métodos para a análise e quantificação de fármacos e seus metabólitos em fluidos biológicos é de grande interesse em diversas áreas do conhecimento. O pré-tratamento de matrizes complexas é uma etapa fundamental para quantificação de compostos em níveis de traços. Métodos de injeção direta de amostras em sistemas de cromatografia líquida 2D têm propiciado maiores precisão e exatidão, além de limites de quantificação cada vez menores. As colunas RAM permitem fazer a exclusão de proteínas e outras macromoléculas presentes na matriz biológica e a extração de analitos de menor massa molecular através de interações hidrofóbicas, iônicas ou afinidade. Neste trabalho, avaliaram-se diversas colunas que possuem diferentes materiais adsorvidos/ligados em sua superfície (BSA, metilcelulose e β -lactoglobulina) bem como colunas com diferentes mecanismo e modos para a retenção dos analitos de interesse (C_8 , C_{18} , SAX, SCX). Utilizando a técnica de acoplamento de colunas com detecção por espectrometria de massas (LC-UHPLC-MS) foi possível quantificar ampicilina em leite bovino empregando uma coluna RAM-BSA, na primeira dimensão, acoplada a uma coluna ACQUITY UPLC BEH, na segunda dimensão. Utilizando o modo MRM, monitoraram-se três transições específicas, $350 > 106$, $350 > 160$ e $350 > 192$ m/z, sendo a primeira, de maior intensidade, para a quantificação e as demais para confirmação. O método desenvolvido é simples, com tempo de análise de 14 minutos, sem qualquer pré-tratamento de amostra, a não ser a centrifugação.

ABSTRACT

ABSTRACT

Quantification of Amoxicilin and Ampicillin Residue by Direct Injection of Bovine Milk.

The development of new methods for analysis and quantification of drugs and their metabolites in biological fluids is of great interest in various areas of knowledge. The pre-treatment of complex matrices is a fundamental step for the quantification of compounds in trace levels. Methods of direct injection of samples by 2D liquid chromatography systems have led to higher precision and accuracy, and quantification limits ever smaller. The use of RAM columns allows the exclusion of proteins and other macromolecules present in biological matrix and extraction of lower molecular weight analytes through hydrophobic, ionic or affinity interactions. In this work, a number of different RAM columns were evaluated with different materials adsorbed or bound on the silica surface (BSA, methylcellulose and β -lactoglobulin). As well as, columns with different modes and mechanism of the analytes retention (C_8 , C_{18} , SAX, SCX) were used. Using the technique of column coupling and a mass spectrometer as detector, ampicillin, was quantified, in bovine milk samples having a RAM-BSA column, in the first dimension coupled to an ACQUITY UPLC BEH column, in the second dimension. MRM mode with three specific transitions, 350> 106, 350> 160 and 350> 192 m/z, were monitored. The first, more intense, was used for quantification while the other two were used for confirmation. The developed method is simple, with analysis time of 14 minutes without any pretreatment of samples, except for centrifugation.

INTRODUÇÃO

Introdução

1.1 - O leite

O leite, caracterizado como colóide de coloração esbranquiçada produzido pela glândula mamária de mamíferos, contém os nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento de recém-nascidos (Tabela 1.1). Possui valor energético de 68 calorias/g e é ligeiramente ácido na forma *in natura*, com pH em torno de 6,40 a 6,65¹.

Tabela 1.1: Composição média das substâncias presentes no leite bovino¹

Substância	%
Água	87,3
Lipídeos	3,9
Sólidos	8,8
Proteínas (3/4 caseína)	3,25
Lactose	4,6
Minerais (Ca, P, Mg, K, Na, Zn, Cl, Fe, Cu)	0,65
Ácidos (cítrico, formiato, acetato, lactato, oxalato); enzimas (peroxidase, catalase, fosfatase, lipase); gases (nitrogênio, oxigênio) e vitaminas (A, C, D, B ₂ , E entre outras)	0,18

Porém, sua composição varia entre indivíduos da mesma espécie ou de espécies diferentes de acordo com a raça, idade, alimentação, estágio de lactação, variações climáticas, entre outros. A Tabela 1.2 compara a proporção, em porcentagem, dos componentes majoritários presentes no leite de acordo com as diferentes espécies².

Tabela 1.2: Composição aproximada do leite bovino, humano, caprino e ovino²

Componente	Bovino (%)	Humano (%)	Caprino (%)	Ovino (%)
Proteína	3,4	1,0	2,9	5,5
Caseína	2,8	0,4	2,5	4,6
Lipídeos	3,7	3,8	4,5	7,4
Lactose	4,6	7,0	4,1	4,8

A maioria das substâncias presentes no leite não se encontra como moléculas individuais em solução. Elas existem como estruturas associadas e complexas, como é o caso dos lipídeos que estão organizados na forma de grandes glóbulos de gordura e são protegidos por uma fina membrana e a caseína que está presente na forma de grandes micelas esféricas.

A ampliação da imagem de uma alíquota de leite permite observar esta organização. Em uma baixa ampliação (5×) é observado um líquido uniforme, porém turvo. Com uma ampliação de 500×, gotas esféricas de gordura, conhecidas como glóbulos de gordura podem ser vistas. Em uma ampliação ainda maior (50000×), as micelas de caseína podem ser observadas, como representado pela Figura 1.1.

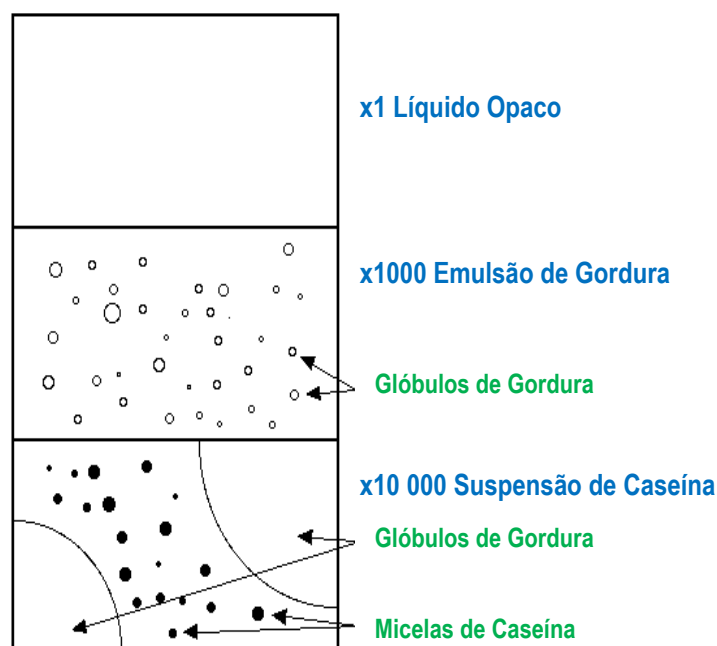


Figura 1.1: Representação esquemática dos principais constituintes do leite. Adaptado da referência¹

A importância do leite na dieta alimentar se deve ao fato deste produto ser fonte de proteínas e minerais essenciais à promoção ao crescimento e a manutenção de uma vida saudável nos três períodos da vida³.

O mercado internacional de produtos lácteos aponta boas perspectivas comercial para o país. Os principais produtores mundiais já alcançaram seu nível máximo de produção. Já o Brasil ainda tem muito que crescer. A produção de leite no país vem aumentando desde 2000, ocupa quinta posição no ranking dos produtores de leite. Os produtos lácteos são enviados para mais de 70 países e movimentam 200 milhões dólares por ano⁴. A Tabela 1.3 mostra um ranking dos principais países produtores de leite no mundo.

Tabela 1.3: Principais países produtores de leite no mundo – 2009

	Países	Volume produzido mil toneladas	% do total
1 ^o	Estados Unidos	85.859.400	14,7
2 ^o	Índia	45.140.000	7,7
3 ^o	China	35.509.831	6,1
4 ^o	Rússia	32.325.800	5,5
5 ^o	Brasil	29.112.000	5,0
6 ^o	Alemanha	27.938.000	4,8
7 ^o	França	23.341.000	4,0
8 ^o	Nova Zelândia	15.400.000	2,6
9 ^o	Reino Unido	13.326.500	2,3
10 ^o	Polônia	12.447.200	2,1

Fonte: FAO/Faostat

Elaboração: Embrapa Gado de Leite. Junho/2011

No Brasil, grande parte da produção está concentrada na região Sudeste, embora o Sul e Nordeste tenham crescido muito. Na região sudeste, o maior produtor é o estado de Minas Gerais, com 30% do leite brasileiro⁵ (Figura 1.2).

Dados recentes do IBGE⁶ indicam que houve produção de 5,167 bilhões de litros de leite industrializado no 3º trimestre de 2010, indicando um

aumento de 5,6% com relação ao 2º trimestre de 2010 e de 6,0% em relação ao 3º trimestre de 2009.

De acordo com os índices apresentados pode-se comprovar a importância econômica, social e nutricional que os produtos lácteos representam. Dessa forma, grande atenção tem sido dada as questões relacionadas a segurança destes alimentos, no qual o desenvolvimento de métodos de análise mais sensíveis e seletivos para o controle de qualidade tem contribuído significativamente para que o país possa continuar despontando nesse setor produtivo e enfrentando os desafios oriundos da competitividade no mercado internacional⁷.

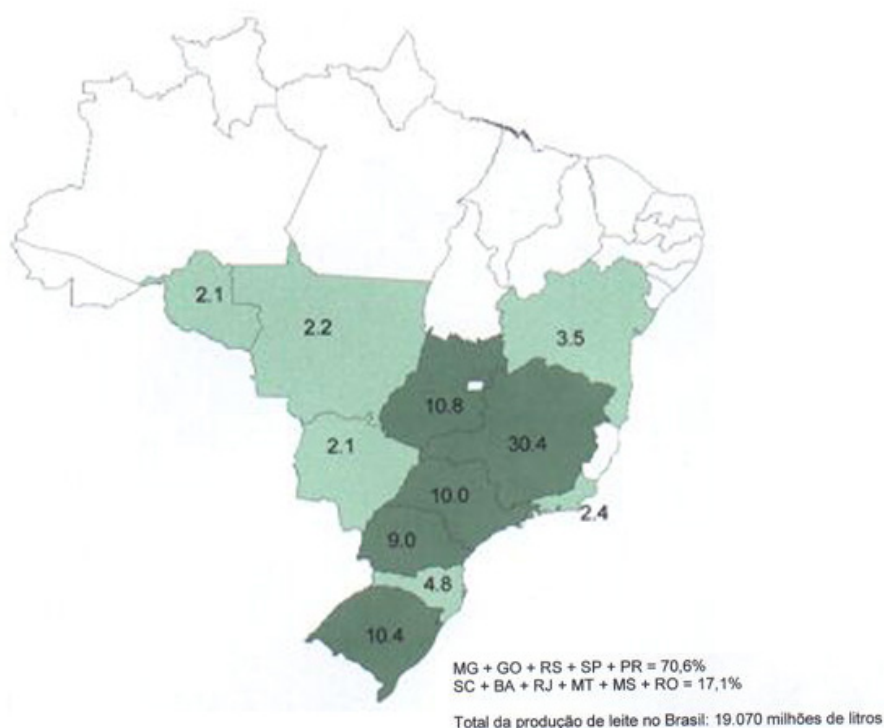


Figura 1.2: Percentual da produção dos principais estados produtores de leite.
Fonte: IBGE – Pesquisa da Pecuária Municipal. Elaboração: Laboratório de Geoprocessamento Embrapa Gado de Leite.

1.1.1 - Mastite

Considerada a doença mais importante do ponto de vista econômico na produção leiteira, a mastite, inflamação das glândulas mamárias de bovinos⁸, é causada por microrganismos que invadem a úbere, se multiplicam e produzem toxinas e outras substâncias irritantes.

É caracterizada por causar uma série de alterações microbiológicas, físico-químicas, organolépticas no leite como alteração de coloração, aparecimento de coágulos e presença de um grande número de leucócitos⁹.

As bactérias gram positivas são responsáveis pela maior incidência de casos espontâneos de mastite predominando a espécie de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus agalactiae*¹⁰.

Os impactos econômicos surgem através da queda na produção leiteira, perda na qualidade do leite, maior custo de produção (Tabela 1.4) e o descarte prematuro de vacas por perda de um ou mais quartos mamários, que se tornam fibrosos e improdutivos¹¹ e sua magnitude varia conforme a intensidade do quadro e o agente causador¹².

Tabela 1.4: Perdas estimadas devido à mastite bovina

Fonte dos prejuízos	%
Redução na produção	66
Descarte do leite	5,7
Custos de substituição	22,6
Trabalho extra	0,1
Tratamento	4,1
Serviços veterinários	1,5

Fonte: Current concepts of mastitis, 4th ed., 1996. National Mastitis Council, Inc., Madison, WI

Além do aumento do número de células, a mastite provoca alterações nos três principais componentes do leite, gordura, proteína e lactose. Nos indivíduos infectados se observa uma redução de proteínas sintetizadas na glândula mamária (α e β caseína, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina) e aumento nas proteínas de origem sanguínea (albumina sérica e imunoglobulinas). As quantidades de proteínas totais do leite têm pouca variação, mas a concentração de cada tipo de proteína varia acentuadamente¹³. Há uma redução nos teores de lactose e um aumento na quantidade de sódio e cloreto, o que confere ao leite um sabor mais salgado. Dessa forma a lactose pode servir como indicador nos casos de perda da qualidade do leite pela mastite¹⁴ (Tabela 1.5).

Tabela 1.5: Alteração na composição do leite devido à mastite. Quantidades médias (g/100g) encontradas no leite normal e leite mastítico¹⁵.

	Leite Normal (%)	Leite Mastítico (%)
Gordura	3,5	3,2
Lactose	4,9	4,4
Proteína Total	3,61	3,56
Caseína Total	2,8	2,3
Proteína do soro	0,8	1,3
Albumina sérica	0,02	0,07
Lactoferrina	0,02	0,1
Imunoglobulina	0,1	0,6
Sódio	0,057	0,105
Cloreto	0,091	0,147
Potássio	0,173	0,157
Cálcio	0,12	0,04

1.2 - Antibióticos na medicina veterinária

Antibióticos são utilizados na medicina veterinária no tratamento de infecções, prevenções de doenças e como aditivos nos alimentos que promovem o crescimento e ganho de massa¹⁶. Sua administração pode ser feita via mamária para o tratamento da mastite; por via parental, na terapia de infecções; por via intrauterina, para o tratamento de infecções uterinas, cervicais e vaginais, e por via oral, para o tratamento de doenças ou como suplemento alimentar, em doses subterapêuticas¹⁷.

O uso indiscriminado de medicamentos veterinários no manejo do gado leiteiro pode levar a presença de resíduos de medicamentos no leite.

Resíduos de antibióticos são substâncias freqüentemente encontradas no leite e trazem efeitos indesejáveis na qualidade, propriedades físico-químicas, qualidade dos produtos lácteos. Além disso, alteram os processos fermentativos na fabricação de queijos e iogurtes, já que as bactérias lácticas são mais sensíveis aos antibióticos, impedindo que a fermentação ocorra satisfatoriamente.

Para os consumidores podem causar efeitos tóxicos diretos como reações alérgicas a indivíduos hipersensíveis, ou problemas indiretos pela indução da resistência de bactérias ao tratamento¹⁸.

A persistência de resíduos de antimicrobianos no leite varia com o produto e depende de vários fatores como, por exemplo, dose e via de administração, excipientes utilizados, solubilidade, entre outros¹⁹.

A importância do controle contínuo de resíduos de antibióticos em leite é enfatizada com respeito a todo o leite e produtos lácteos utilizados na alimentação humana. Os principais antibióticos veterinários usados hoje incluem β -lactâmicos, sulfonamidas, tetraciclina, aminoglicosídeos, clorafenicóis, macrolídeos e quinolonas.

Para monitorar a quantidade de resíduos de antibióticos em leite são comumente utilizados testes de triagem imunológicos e microbiológicos, além de técnicas analíticas específicas e sensíveis, como a cromatografia líquida de alta eficiência.

Nascimento *et al*¹⁹ avaliaram a ocorrência de resíduos de antibióticos em 96 amostras de leite pasteurizadas de 6 diferentes marcas adquiridas em estabelecimentos comerciais de Piracicaba, SP por meio de ensaio microbiológico; 50% das amostras apresentaram resíduos de antibióticos, sendo que uma das marcas apresentou 72,5% das amostras com resíduo de ampicilina e outra com 50% das amostras contendo outros inibidores incapazes de ser identificados pela metodologia proposta.

Nero *et al*²⁰ realizaram um estudo em 210 amostras de leite cru coletadas em quatro regiões produtoras de leite no Brasil. A presença de resíduos foi detectada em 24 amostras com uma maior incidência na região de Londrina.

No Brasil, o órgão responsável por estabelecer os limites máximos de resíduos em alimentos é o Ministério da Agricultura através do Plano Nacional de

Controle de Resíduos (PNCR) que exige a pesquisa periódica de resíduos de antibióticos em leite, que não devem ser superiores aos Limites Máximos de Resíduos (LMR) previstos para cada grupo específico (Tabela 1.6)²¹.

Se tais limites não estão estabelecidos por este ministério, utiliza-se as diretrizes estabelecidas pela CODEX ALIMENTARIUS²² ou Food and Drug Administration, Estados Unidos²³.

Tabela 1.6: Nivel máximo de resíduo permitido para antibióticos em leite

Substância Antimicrobiana	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
β -lactâmicos	
Penicilina G	4
Amoxicilina	4
Ampicilina	4
Ceftiofur	100
Cefapirina	NE*
Sulfametazina	100
Sulfadimetoxina	100
Gentamicina	NE
Oxitetraciclina	100
Tilosina	NE

*NE = não especificado

Fonte: PNCR, Instrução Normativa 42, 1999

1.2.1 - Antibióticos

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos que promovem a inibição do crescimento ou morte de fungos ou bactérias. Podem ser classificados de acordo com a sua origem, biossíntese, ação predominante e mecanismo de ação.

De acordo com a sua origem, os antibióticos podem ser divididos como produzidos por bactérias, fungos e actinomicetos.

Em relação a sua biossíntese podem ser derivados de aminoácidos, açúcares, acetatos e propiátos entre outros.

Como ação predominante, mais conhecida como espectro de atividade, existem aqueles com atividade predominante em bactérias gram-positivas, gram-negativas, micobactérias, antimicóticas e de amplo espectro.

Segundo o mecanismo de ação, podem ser classificados em: a) antibióticos de ação superficial, que interferem no transporte ativo através da membrana; b) antibióticos que inibem a biossíntese da membrana ou protéica; e c) antibióticos que impedem a ação de cofatores enzimáticos (Figura 1.3)²⁴.

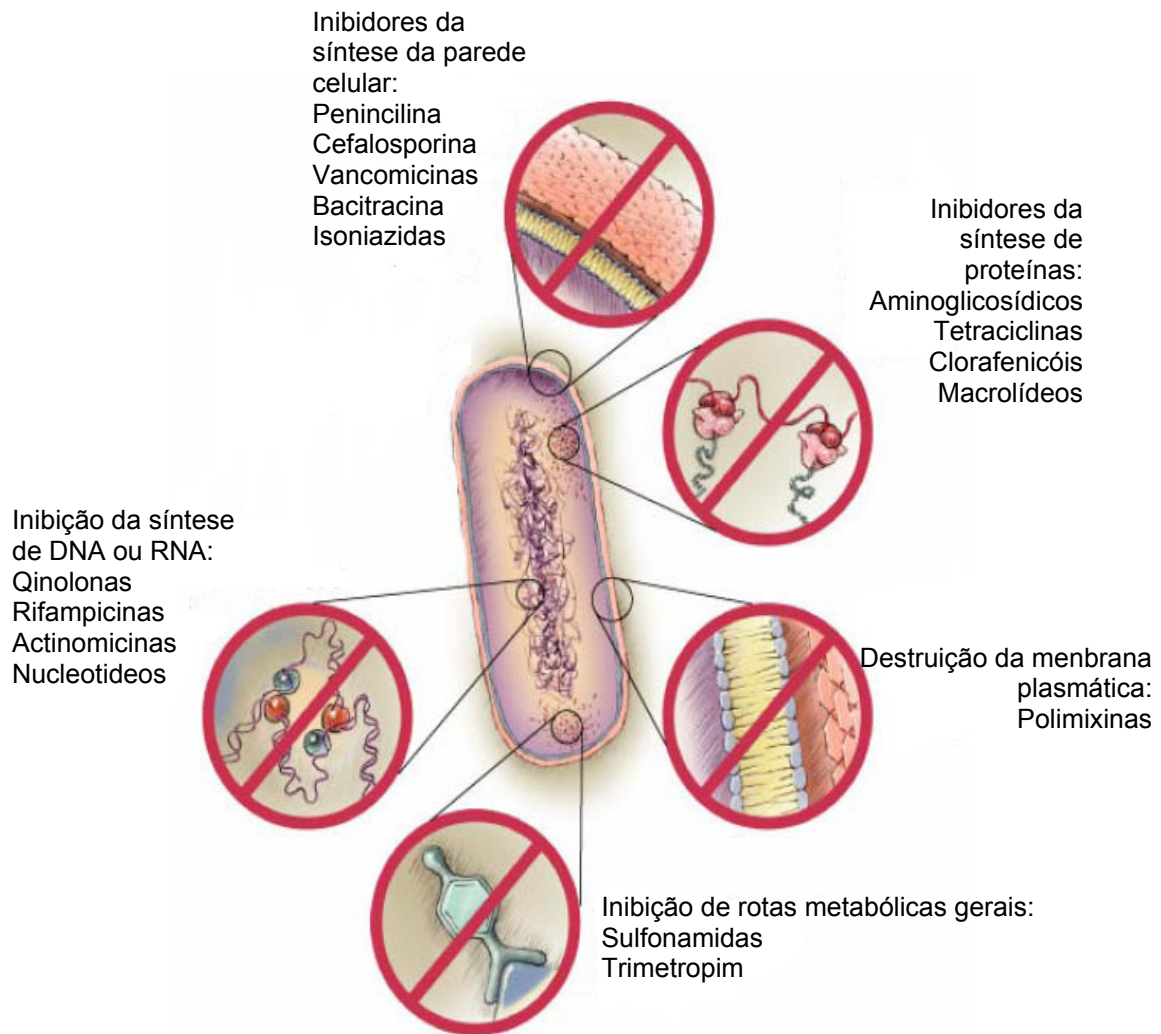


Figura 1.3: Mecanismo de ação dos antibióticos. Adaptado da referência²⁴.

Estima-se que o consumo mundial de antibióticos está na faixa de 100 a 200 mil toneladas por ano ²⁵.

1.2.1.1 - Antibióticos β -lactâmicos

A história das penicilinas se iniciou com Alexander Fleming em 1928 ao observar a produção de um agente antimicrobiano por fungos. Posteriormente, Fleming identificou a colônia como sendo uma espécie rara de *Penicillium*. Porém somente em 1938, Florey e Chain chegaram ao extrato bruto contendo a penicilina que se tornou o primeiro antibiótico a se tornar disponível para uso clínico²⁶.

As penicilinas correspondem aos mais seletivos agentes microbianos apresentando um elevado índice terapêutico. Contém em sua estrutura um anel β lactâmico, que interage com proteínas denominadas PBPs (Penicillin Binding Protein), inibindo a enzima envolvida na transpeptidação, responsável pela ligação entre as cadeias de tetrapeptídeos do peptidoglicano. Com isso, há o impedimento da formação das ligações entre os tetrapeptídeos de cadeias adjacentes de peptidoglicano, ocasionando a perda da rigidez da parede celular²⁷. Acredita-se também que tais drogas podem atuar promovendo a ativação de enzimas autolíticas, resultando na degradação da parede celular (Figura 1.4).

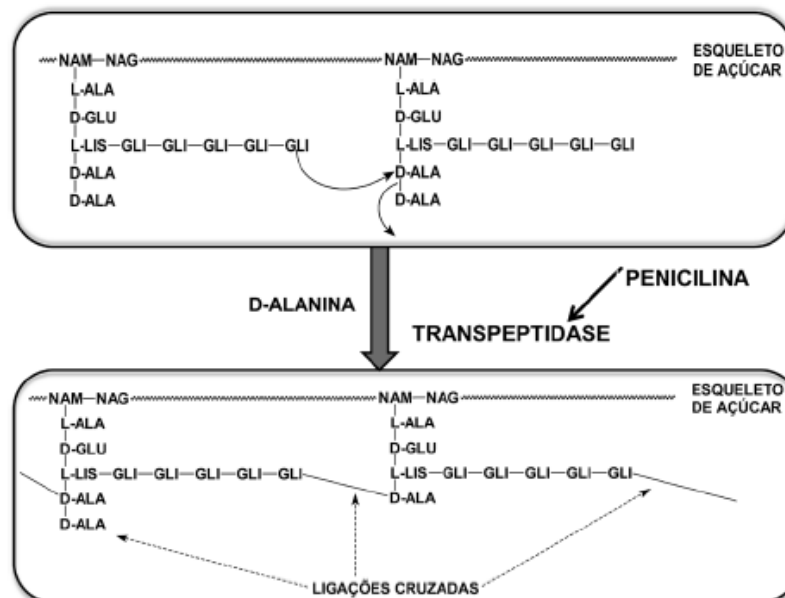


Figura 1.4: Formação da ligação cruzada para a construção da parede celular de bactérias²⁶.

Todos os antibióticos β lactâmicos têm um elemento estrutural em comum, um anel de quatro membros (β lactâmico) geralmente fundido a outro anel de cinco (tiazolidina) ou seis (dihidrotiazina) membros, formando as penicilinas ou cefalosporinas respectivamente (Fig. 1.5). Tal sistema bicíclico é fundamental por mimetizar o resíduo dipeptídico terminal D-Ala-D-Ala da cadeia peptidoglicana, substrato da enzima transpeptidase (Figura 1.6).

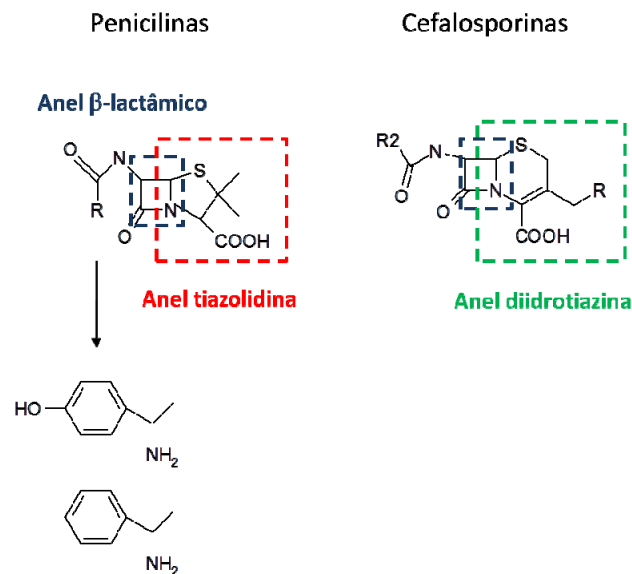


Figura 1.5: Representação estrutural dos antibióticos β lactâmicos e cefalosporínicos

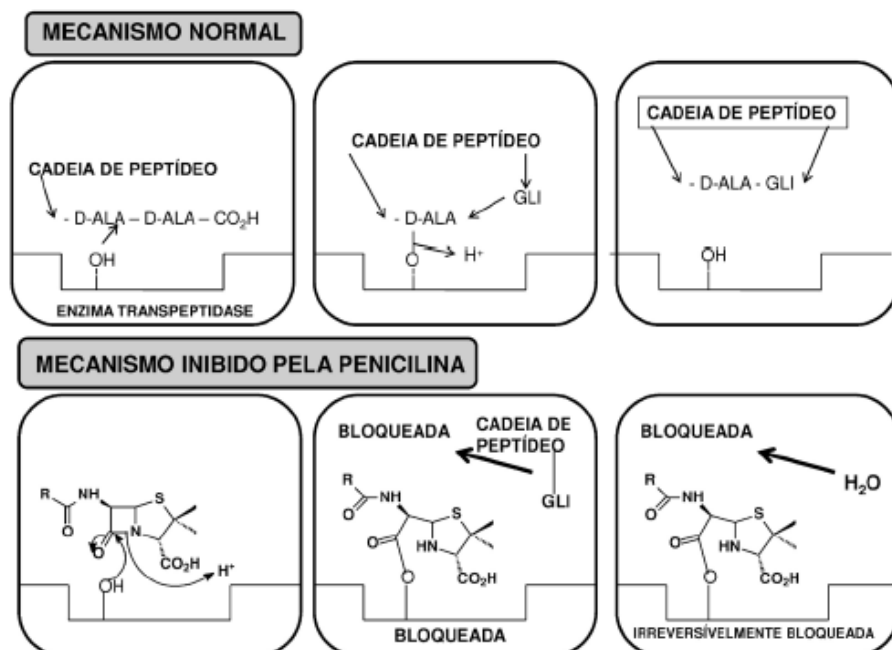


Figura 1.6: Mecanismo de ação normal e mecanismo inibido pela molécula de penicilina²⁶.

Além do sistema bicíclico, a cadeia lateral (R) determina a estabilidade e o espectro de atividade de diferentes derivados, já que o sistema bicíclico tensionado proporciona instabilidade química ao anel β -lactâmico que fica, dessa forma, susceptível ao ataque nucleofílico, comprometendo assim a integridade do grupo farmacofórico.

No caso de ampicilinas, amoxicilinas e oxacilinas foram adicionados grupos retiradores de elétrons no carbono α ao carbono carbonílico da cadeia lateral de penicilinas, que diminuem a nucleofilicidade do oxigênio carbonílico aumentando assim a estabilidade em meio ácido. Além de aumentar o espectro de atividade frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas²⁷.

A ampicilina foi a primeira penicilina semi-sintética que mostrou ação contra bacilos gram-negativos, ampliando o espectro de ação das penicilinas. É comercializada na forma anidra, tri-hidratada e sódica²⁸.

1.2.2 - Métodos empregados para a determinação de antibióticos β -lactâmicos.

O primeiro documento a retratar a análise de resíduos químicos em alimentos de origem animal é da década de 70. Resíduos podem ser definidos como substâncias presentes na matriz (carne, leite, ovos, entre outros) em baixas concentrações ($\mu\text{g kg}^{-1}$ ou ng kg^{-1}), após algum tipo de administração²⁹.

Os métodos mais comumente usados para detectar resíduos de antibióticos eram testes de inibição, por meio de culturas utilizando vários microrganismos como *B. subtilis*, *Sarcina lutea*, *Strep thermophilus* e *Strep lactis* ou kits de testes rápidos baseados em receptores imunes (Twin-Sensor, b-Screen, Charm II assay, b-star, etc.)³⁰. Apesar de tais métodos serem versáteis, simples e relativamente baratos, eles determinam o número aproximado da quantidade de resíduos detectados, são pobres em seletividade e especificidade, pois estão sujeitos a interferências causadas por inibidores não específicos ou outros fármacos antimicrobianos^{31,32}.

O controle efetivo e eficiente de substâncias ilegais requer o uso de métodos confirmatórios que sejam sensíveis, seletivos, seguros e robustos.

Rudan *et al*³³ utilizaram métodos microbiológicos e de imunoensaios para a determinação de antibióticos em leite bovino. Porém, para identificar os falsos

positivos, as amostras com possíveis níveis de resíduos foram analisadas por HPLC-DAD. Os falsos positivos são resultados da interação com algumas substâncias utilizadas para a conservação do leite ou sanitização do maquinário.

Uma grande variedade de métodos utilizando como ferramenta a cromatografia líquida de alta eficiência vem sendo utilizadas para a análise de compostos em fluidos biológicos.

A determinação de antibióticos β -lactâmicos em água, leite e carne de frango através da cromatografia líquida capilar apresenta algumas vantagens se comparada a cromatografia tradicional, como o menor consumo de solventes, amostras e menor quantidade de resíduos. O trabalho desenvolvido por Bailón-Pérez *et al*³⁴ utilizou a técnica de extração em fase sólida (SPE) com o uso de cartuchos Oasis HLB para o pré tratamento de amostras. A separação cromatográfica ocorreu em uma coluna capilar C₁₈ e para o sistema de detecção fez-se o uso de um detector de arranjo de diodos (DAD).

Porém, a absorvidade molar destes antibióticos em baixos valores de comprimento de onda (230 nm) faz com que análises utilizando como detector um espectrofotômetro seja um desafio³⁵.

Por esta razão métodos sensíveis e seguros têm sido desenvolvidos principalmente empregando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) ou em série (LC-MS/MS), com pré concentração, empregando a técnica de extração em fase sólida.

Nos últimos cinco anos houve um grande aumento do uso da técnica de ionização a pressão atmosférica LC-MS/MS na determinação de resíduos de fármacos veterinários.

A técnica de ionização por eletronebulização se tornou a forma mais popular para a ionização de moléculas. Entretanto, a escolha do modo de operação, positivo ou negativo, depende da composição da fase móvel utilizada e das características estruturais da molécula.

Martinez-Huelamo e colaboradores³² desenvolveram métodos para a determinação de oito penicilinas por LC-UV, LC-MS e LC-MS/MS em leite utilizando o SPE como técnica de preparo de amostra. Foram testados cinco tipos de cartuchos com diferentes propriedades de retenção (Bond Elut C₁₈, Isolute ENV+, Oasis HLB, Oasis MAX e SDB-RPS). Aquele que apresentou melhores valores de recuperação foi o Oasis HLB. A separação cromatográfica ocorreu em uma coluna

analítica Lichrosphere RP-18. As análises no espectrômetro de massas foram realizadas no modo positivo de ionização através do monitoramento de reações múltiplas (MRM), nas quais foram monitoradas duas transições, uma para a quantificação e outra para a identificação dos compostos em estudo.

Kantiani *et al.*³⁶ utilizaram a técnica de extração em fase sólida (C₁₈) acoplado a uma coluna de fase reversa (C₁₂), SPE-LC/ESI-MS-MS, para a determinação de antibióticos penicilínicos e cefalosporínicos em leite. A identificação e confirmação dos compostos foi feita através do monitoramento de duas transições específicas no modo MRM com os analitos também ionizados positivamente (ESI(+)). Em ambos os casos, foi utilizado como fase móvel uma mistura de acetonitrila e água com uma porcentagem de 0,1% de ácido fórmico.

Fernandez-Torres e colaboradores³⁵ estudaram o uso da cromatografia líquida de alta eficiência com sistema de detecção arranjo de diodos-fluorímetro (DAD-FL) na determinação de 11 antibióticos e seus metabólitos em urina com otimização de dois métodos de pré tratamento de amostras (SPE e tratamento direto com metanol e acetonitrila). O método pode ser aplicado para análise de rotina em pacientes em tratamento com diferentes formulações.

De modo geral, na maioria dos trabalhos publicados para antibióticos β -lactâmicos, encontra-se o uso de colunas no modo reverso de eluição, a utilização de soluções tampão com diferentes valores de pH; cromatografia de par iônico e de troca iônica.

Como etapa de pré-tratamento, os métodos envolvem a precipitação de proteínas, extração líquido-líquido ou extração em fase sólida.

1.3 - Preparo de amostras

O preparo de amostras, etapa responsável por 80% de todo o processo analítico, é requisito essencial para a obtenção de um método seletivo e sensível destinado a análise de traços em matrizes complexas³⁷.

Idealmente deve ser um processo rápido, de fácil execução, barato e compatível com uma grande variedade de equipamentos, gerar perda mínima de amostra, uma boa recuperação e ser eficiente quanto a eliminação de interferentes presentes na matriz com menor manuseio de amostras.

Apresenta como etapas principais a extração, o isolamento e a concentração do fármaco de interesse presente na matriz complexa³⁸. Porém, a dificuldade no seu desenvolvimento consiste no fato de que substâncias presentes na matriz biológica podem apresentar propriedades físico-químicas e semelhança estrutural se comparado com o analito de interesse, além do fato de este estar em baixas concentrações.

São utilizadas para a extração e/ou pré-concentração de compostos presentes em fluidos biológicos, as clássicas e bem estabelecidas técnicas de precipitação de proteínas³⁹, extração líquido-líquido^{40,41} e extração em fase sólida (SPE, *solid phase extraction*). Porém, estas técnicas apresentam algumas desvantagens, apresentadas na Tabela 1.7. Além disso, o pré-tratamento de matrizes complexas contaminadas com antibióticos β -lactâmicos é dificultado pela característica anfótera e alta polaridade dos mesmos (o que possibilita a co-eluição com compostos endógenos), baixa solubilidade em solventes orgânicos e em condições ácidas (o que dificulta etapas de extração líquido-líquido para o pré-tratamento de amostras). Tais desvantagens por estas técnicas impulsionaram (ou motivaram) o desenvolvimento de novos métodos, cujo objetivo é a miniaturização, que proporciona a utilização de uma menor quantidade de amostras, obtenção de maior seletividade e especificidade na extração, menor consumo de solventes orgânicos e a capacidade de automação (preparo de amostras *on-line*).

Tabela 1.7: Desvantagens oferecidas pelas técnicas de pré-tratamento de amostras mais usuais.

Técnica	Desvantagem
Precipitação de Proteínas	Não há a eliminação dos demais interferentes, apenas proteínas
Extração Líquido-Líquido	Solvente de extração imiscível com a amostra, dificuldade de extração de compostos polares, grande volume de solventes orgânicos
Extração em Fase Sólida	Analito pode estar dissolvido em solventes incompatíveis com o sistema analítico

A técnica de microextração em fase sólida (SPME), proposta por Pawliszyn e colaboradores⁴², consiste de uma fibra de sílica fundida coberta por um

filme de um polímero ou adsorvente sólido capaz de adsorver o analito de interesse⁴³. A fibra pode estar imersa diretamente na solução da amostra, ou suspensa (headspace), no caso de analitos voláteis. Seu acoplamento com o HPLC (SPME/HPLC) necessita de uma interface, câmara de dessorção, utilizada para a dessorção com solventes antes da análise no sistema cromatográfico⁴⁴. Entretanto, apresenta como desvantagem e maior limitação, os baixos valores de recuperação e o fato de que as fibras revestidas serem caras e não poderem ser utilizadas várias vezes^{45,46}.

A técnica de microextração em fase líquida (LPME, *Phase Liquid Microextraction*) foi desenvolvida com intuito de minimizar as desvantagens da LLE, aumentar a extração dos analitos e o número de análises por tempo. Foi introduzida no ano de 1996⁴⁷ e durante os anos foram desenvolvidas diferentes formas de abordagens: i) microextração em gota suspensa (SDME); ii) microextração em fase líquida com fibras ocas (HF-LPME); iii) microextração líquido-líquido dispersiva (DLLE).

Porém, a LPME possui como base o princípio de que os analitos são extraídos da matriz, fase aquosa, através de uma fase aceptora orgânica^{48,49}. Esta fase aceptora pode estar imersa diretamente ou permanecer suspensa sobre a matriz na qual será feita a extração.

Várias técnicas de microextração em fase líquida têm sido empregadas para a análise por LC e, dentre elas, destacam-se: a microextração líquido-líquido dispersiva, microextração em fase sólida com fibras ocas e a microextração em gota suspensa.

A microextração líquido-líquido dispersivo (DLLE, *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*), desenvolvida por Assady *et al.*⁵⁰, envolve a interação entre um solvente dispersante e um solvente de extração com a matriz da amostra que contém os analitos de interesse, há a formação de uma emulsão e após este processo faz-se a centrifugação, os analitos são então sedimentados, extraídos e analisados⁵¹⁻⁵⁴. Vários trabalhos na literatura relatam a influência de fatores tais como, tipo e volume de agente dispersante, pH e concentração de sais na extração de fármacos em matrizes biológicas^{53,55,56}.

Na microextração em fase líquida com fibras ocas (HF-LPME, *Hollow-Fiber Liquid-Phase Microextraction*), um solvente orgânico de extração imiscível em água é impregnado nos poros de uma membrana capilar porosa e hidrofóbica e seu

lúmen preenchido com microlitros de uma fase aceptora⁴⁶. Os analitos, que devem possuir uma solubilidade maior em solventes orgânicos, são então extraídos da amostra, por difusão e posteriormente transferidos para uma solução aceptora.⁵⁷⁻⁵⁹ Ebrahimzadeh *at al.* desenvolveram um estudo que relata o uso da técnica HF-LPME combinada com HPLC-UV na determinação de resíduos de propiltiouracil em matrizes biológicas. O método de pré-tratamento foi otimizado de forma a extrair um composto com característica polar utilizando diferentes concentrações de contra-íons na fase aceptora. Isso se deve ao fato de que geralmente solventes orgânicos são imobilizados nos poros da fibra o que dificulta a solubilidade de extração de moléculas com características polares. A proposta é então adicionar reagentes iônicos relativamente hidrofóbicos à fase doadora ou orgânica, permitindo a formação de um par iônico com o analito de interesse⁶⁰. A técnica de HF-LPME também foi utilizada para a análise de ácido salicílico, ibuprofeno, diclofenaco e seus respectivos metabólitos em amostras de urina⁶¹ além de outros fármacos na mesma matriz^{59,62-64}, monitoramento dos níveis de fármacos em plasma^{65,66} e na determinação de contaminantes na água^{57,64}.

Finalmente, a microextração com gota suspensa (SDME, *Single-Drop Microextraction*), em que a fase extratora é a gota de um solvente orgânico imiscível em água suspensa em uma ponta de agulha, a gota após ser exposta a amostra e fazer a extração dos analitos de interesse é retraída para a seringa e injetada no sistema cromatográfico^{67,68}. A gota pode estar em contato direto com a solução de interesse, ou suspensa em um “headspace” o que leva a algumas vantagens como baixo custo, consumo de solventes e amostras⁶⁹.

1.3.1 - Preparo de Amostras *on line*

Com o desenvolvimento de novos métodos de injeção direta de amostras há a natural substituição das técnicas de preparo de amostras *off line*. O preparo *on line* traz vantagens como a redução das etapas destinadas ao *clean up*, a concentração do analito de interesse, uma menor manipulação por parte dos analistas diminuindo assim as fontes de erros, a possibilidade de contaminação, perda de analitos, gasto com solvente e um maior número de análises por tempo⁷⁰.

Devido ao grande sucesso da técnica de extração em fase sólida (SPE) na sua configuração *off line*, desenvolvimentos tecnológicos foram feitos de modo a

possibilitar o acoplamento da SPE aos sistemas de LC, dando origem ao SPE *on line*⁷¹⁻⁷⁵. Posteriormente fases especiais foram criadas e possibilitaram novos avanços no preparo de amostras *on line*, são elas: colunas de meio de acesso restrito (RAM)⁷⁶, colunas de fluxo turbulento e colunas monolíticas⁷⁷⁻⁷⁹ e de polímeros molecularmente impressos⁸⁰.

As colunas RAM são principalmente utilizadas na análise de micromoléculas (fármacos, substâncias endógenas, xenobióticos entre outros) em matrizes complexas contendo macromoléculas (proteínas). A expressão meio de acesso restrito (*restricted access media* - RAM) foi introduzida por Desilets *et al.* em 1991⁸¹. Tais colunas eliminam a necessidade de haver um pré-tratamento de amostras e podem ser utilizadas como pré colunas, em um sistema multidimensional, acopladas a colunas analíticas por uma válvula de comutação (*column switching*).

Apresentam os princípios da cromatografia de interações hidrofílicas, hidrofóbicas, troca iônica e exclusão por tamanho.

A fase hidrofílica recobre a superfície externa e é responsável pela repulsão das macromoléculas, impossibilitando que haja a adsorção no suporte cromatográfico. Este mecanismo é combinado a exclusão por tamanho o que impossibilita que moléculas maiores entrem nos poros. A fase hidrofóbica ou de troca iônica recobre a superfície interna dos poros onde pequenas moléculas de analito penetram e interagem com a superfície interna dos poros. A Figura 1.7 esquematiza a retenção seletiva das micromoléculas, enquanto as macromoléculas são excluídas.

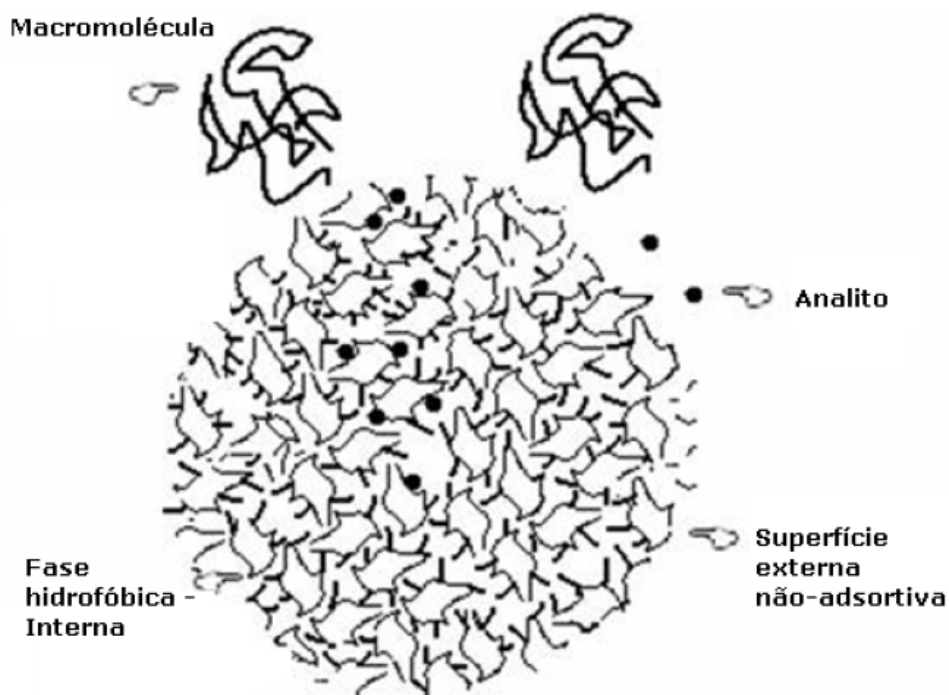


Figura 1.7: Esquema do mecanismo proposto para a exclusão de macromoléculas⁸².

Atribui-se a criação desse novo material a Hagestam e Pinkerton que apresentaram o conceito de internal surface reversed-phase (ISRP)⁸³ para análise de fármacos em fluídos biológicos.

Em 2006, Cassiano *et al*⁸² apresentaram uma revisão na qual discutiram o histórico e os modos de classificação das colunas de meio de acesso restrito.

As fases bimodais com proteínas imobilizadas em sua superfície têm sido utilizadas em nosso grupo de pesquisa com bastante sucesso. Foram inicialmente estudadas no grupo de Yoshida através da saturação de sílicas alquílicas (C₁₈) com proteínas desnaturadas (α 1-ácido glicoprotéico (AGP) humana)⁸⁴ e comercializada com nome de Bio Trap.

Nesta mesma classe estão os estudos desenvolvidos por Menezes *et al*, em que suportes de sílica C₈ e C₁₈ foram recobertos com albumina sérica bovina (BSA) ou humana (HSA) e estabilizadas através de ligação cruzada com glutaraldeído⁸⁵⁻⁸⁷.

As colunas de meio de acesso restrito com proteína imobilizada (RAM-BSA) são utilizadas com grande sucesso há 10 anos em nosso grupo com diferentes matrizes como plasma⁸⁸⁻⁹², leite bovino⁹³⁻⁹⁶, ovos⁹⁷ e águas residuais⁹⁸. Sendo o

primeiro trabalho publicado pelo grupo o de Cassiano *et al*⁹⁹ na quantificação dos enantiômeros do metirapol em presença da metirapona em plasma humano.

1.4- Espectrometria de Massas

1.4.1 - Fonte de Ionização

O desenvolvimento da técnica da ionização a pressão atmosférica (API) acoplado a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a espectrometria de massas (LC-MS/MS) introduziu uma nova era na análise qualitativa e quantitativa de resíduos de medicamentos veterinários. A API que inclui tanto a ionização por eletronebulização (ESI) como a ionização química por pressão atmosférica (APCI), complementa a clássica tecnologia de GC/MS tornando possível a determinação de compostos com massas moleculares maiores e substâncias não voláteis, sem a necessidade da derivação¹⁰⁰.

A escolha da interface para a ionização de um dado analito deve ser feita levando-se em conta sua natureza química¹⁰¹. Analitos que já estão ionizados em solução, como os fármacos analisados neste estudo, são melhores analisados por ESI, onde ocorre a transferência do íon da solução para a fase gasosa, enquanto na APCI a ionização ocorre na fase gasosa^{102,103}.

Os mecanismos de ionização por eletronebulização (ESI) ainda estão em estudo, porém a proposta mais aceita é que na primeira etapa há a formação de um spray eletrolítico que gera pequenas gotas carregadas, e destas são liberados os íons. É feita através da inserção do líquido efluente bombeado do LC com vazão de baixa velocidade a um microcapilar carregado por um forte campo magnético, o que faz com que seja criado um jato fino de partículas altamente carregadas¹⁰⁴.

Há a eliminação do solvente por evaporação e para auxiliar neste processo há um fluxo de gás inerte secante, normalmente nitrogênio. Conseqüentemente, com a diminuição das gotas, estas se tornam cada vez mais instáveis devido a forças eletrostáticas que excedem a força da tensão superficial (limite de "Rayleigh") o que faz com que restem apenas íons da amostra que serão levados ao analisador. Este processo também é conhecido como explosões de Coulomb ou "Coulômbicas"¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ (Fig. 1.8).

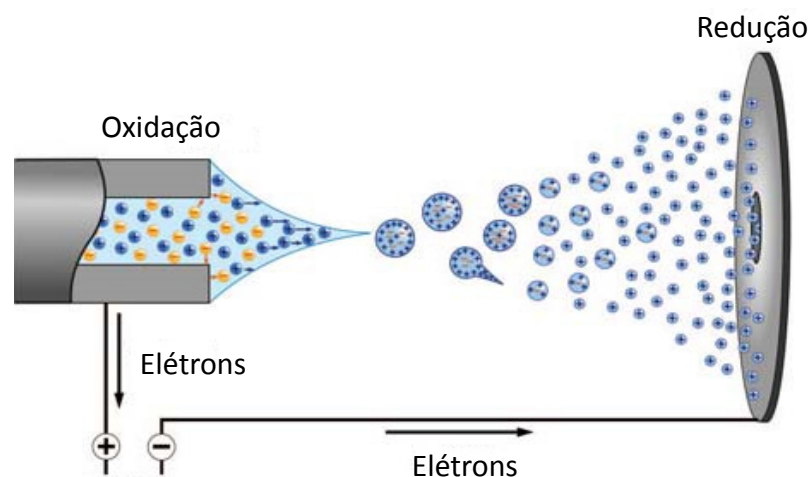


Figura 1.8: Esquema de formação do electro spray no modo positivo. Adaptado da referência¹⁰⁷.

A formação do spray é diretamente afetada pela voltagem do capilar, vazão, tipo e concentração do tampão utilizado como fase móvel.

A dessolvatação das gotas formadas e a ionização dos analitos são favorecidas pela formação inicial de pequenas gotas. Por esta razão, solventes com alta tensão superficial e/ou altas viscosidades devem ser evitados. A concentração do tampão também afeta diretamente o tamanho da gota formada, quanto maior sua concentração menor será o tamanho da gota, porém a concentração do tampão também afeta a eficiência da ionização do analito e em altas concentrações a relação entre a resposta do detector e a concentração do analito pode ser não linear^{106,108}.

A vazão da fase móvel afeta o tamanho e a distribuição dos tamanhos das gotas formadas durante o processo de formação do electro spray e conseqüentemente, o número de cargas em cada gota. Logo em menores vazões, gotículas de menores diâmetros são formadas culminando em uma melhor liberação de íons para a fase gasosa e melhora nos resultados¹⁰⁹.

Outro fator que altera a formação do electro spray é a voltagem do capilar, os valores de voltagem elevados levam a formação de gotas menores, porém tais valores não podem ser tão elevados a ponto de haver uma descarga de alta tensão ao invés da formação de gotículas.

1.4.2 - Analisadores

Em geral as análises de fármacos em matrizes biológicas envolvem analisadores de massas do tipo triplo quadrupolo, íon trap ou um híbrido destes. Instrumentos do tipo triplo quadrupolo, que são muito utilizados na quantificação de resíduos, produzem íons através da fragmentação por colisão induzida, no modo MRM, fornecendo assim íons filhos com o monitoramento de transições específicas (MS^2). Já os que possuem analisadores do tipo íon trap podem produzir uma quantidade maior de íons fragmentos (MS^n), o que fornece um espectro de massas mais detalhado possibilitando a caracterização e confirmação estrutural de um dado composto^{103,105}.

Tais características fazem da espectrometria de massa em tandem altamente sensível e capaz de alcançar limites de detecção cada vez menores já que, ao monitorar uma transição específica há um considerável aumento na relação sinal/ruído sendo possível eliminar moléculas de interferentes que possuam massa molecular próxima ao analito de interesse¹¹⁰.

Novas tecnologias de equipamentos híbridos, tais como o linear íon trap (LITs), linear íon trap orbitrap (LTQ-orbitrap), quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF), oferecem a vantagem de escanear massas em alta velocidade, precisão e detectabilidade além da capacidade de operar em diferentes modos de aquisição^{103,111}.

Um analisador do tipo quadrupolo, utilizado para separar ou diferenciar íons, consiste de quatro hastes simetricamente arranjadas às quais são aplicadas correntes de rádio frequência (RF) e correntes direta (DC) que funcionam como um separador de massas, ou filtro, de forma que somente íons com uma determinada faixa de massa exibem oscilações de amplitude constante que podem assim ser coletados pelo analisador (Fig. 1.9).

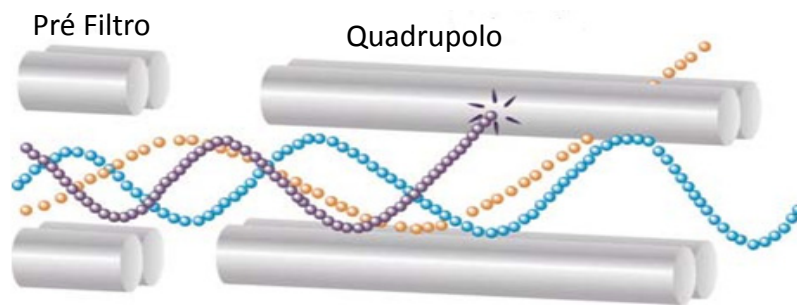


Figura 1.9: Feixe de íons em um analisador quadrupolar. Adaptado da referência¹¹².

Neste arranjo, três quadrupolos são dispostos de forma que somente o primeiro e o terceiro são utilizados como analisadores.

O primeiro quadrupolo (Q1) funciona como um filtro de massas que transmite e acelera os íons para a célula de colisão (Q2). Esta pode ser um quadrupolo ou octapolo, preenchida com gás inerte (hélio, nitrogênio ou argônio) em que é aplicada somente a corrente de radio frequência (RF), não havendo dessa forma seleção de massa. A pressão em Q2 é bem alta o que faz com que os íons colidam com o gás inerte tendo como resultado uma fragmentação por colisão induzida (CID – *collision-induced dissociation*). Os íons são então acelerados para o terceiro quadrupolo (Q3) que é também um analisador e fará a seleção dos fragmentos de interesse (Fig. 1.10)¹⁰⁰.

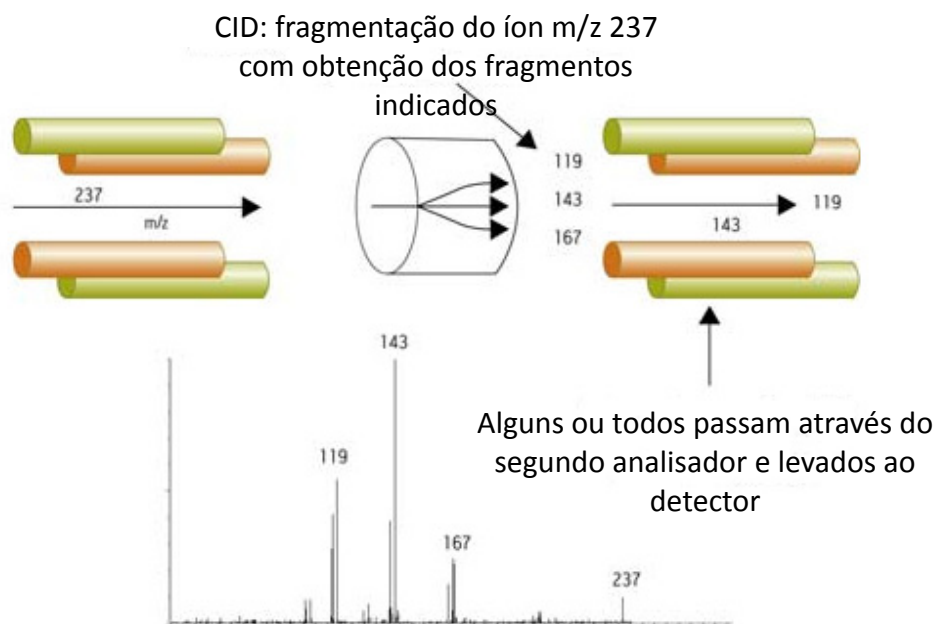


Figura 1.10: Esquema de funcionamento de um equipamento com dois analisadores quadrupolares em tandem. Adaptado da referência¹¹³.

1.5 – Cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência se mostrou uma técnica bem estabelecida no desenvolvimento de métodos analíticos na área de determinação de fármacos em matrizes complexas. Isso se deve ao fato de ser uma técnica robusta, de fácil operação, sensível, seletiva e cujos processos de interação de compostos com o suporte cromatográfico são bem entendidos e estudados.

Porém, a principal limitação se deve ao fato da técnica mostrar uma menor eficiência especialmente se comparado com as técnicas de cromatografia gasosa (CG) e eletroforese capilar (CE), já que, a busca está em tempo de corrida cada vez menores e/ou aumento no número de bandas que podem ser separadas em uma dada janela de tempo.

Esta menor eficiência está intimamente relacionada com os baixos coeficientes de difusão do analito na fase líquida, o que resulta em uma baixa velocidade de difusão na fase estacionária. Para minimizar tais efeitos, diferentes estratégias podem ser adotadas através do uso, de partículas cada vez menores, colunas monolíticas e sistemas capazes de operar em altas temperaturas.

A cromatografia líquida de alta temperatura permite usar vazões maiores sem que haja uma diminuição na eficiência e aumento da pressão do sistema. Os altos valores de temperatura ($60 < T < 200^{\circ}\text{C}$) diminuem a viscosidade da fase móvel e aumentam a velocidade de difusão dos solutos. A limitação é dada pelo reduzido número de suportes capazes de suportar altos valores de temperatura assim como a potencial degradação de compostos termolábeis¹¹⁴.

As colunas monolíticas que possuem partículas porosas como suporte, podem operar em vazões maiores sem provocar um aumento na pressão do sistema. Entretanto, tais suportes apresentam baixa estabilidade em altos valores de pH, assim como limitadas possibilidades quanto ao tipo de sílica e dimensão da coluna utilizada.

O uso de partículas cada vez menores (sub- $2\mu\text{m}$) como suportes cromatográficos possibilita que o caminho de difusão percorrido pelos analitos seja menor, permitindo assim, um aumento na velocidade sem que haja um comprometimento da eficiência de separação.

Isto é evidente e ilustrado pela equação de van Deemter (equação 1) que relaciona a eficiência, expresso pela altura equivalente a um prato teórico (H), velocidade linear da fase móvel (u) e o tamanho de partícula (d_p).

$$H = Ad_p + \frac{BD_M}{u} + \frac{Cdp^2\mu}{D_M} \quad (1)$$

Onde D_M = coeficiente de difusão do analito e A, B e C são constantes.

O termo A refere-se ao alargamento da banda devido aos diferentes caminhos percorrido pelo analito. O termo B relacionado à difusão longitudinal, ou difusão do soluto na fase móvel e o termo C descreve a transferência de massa do analito entre a fase móvel e estacionária.

O ônus deste processo está no aumento da pressão do sistema o que não é compatível com um HPLC convencional conforme a equação 2¹¹⁵.

$$P = \Phi \frac{L\eta\mu}{100d_p^2} \quad (2)$$

Onde, P = pressão, Φ = resistência mecânica a vazão, L= comprimento da coluna (mm), η = viscosidade da fase móvel (mPa/s), μ = velocidade linear (mm/s) e d_p = diâmetro da partícula (μm).

Em 2004 surge um novo equipamento capaz de operar condições de altas pressões, este foi introduzido pela Waters Corporation com o nome de *Acquity ultra performance liquid chromatography system* (UPLC). Enquanto em cromatógrafos líquidos convencionais o valor máximo de pressão está entre 35-40 MPa, no sistema UPLC este valor é de 103,5 MPa (15000 psi).

Este novo sistema, também possui algumas modificações de forma a possibilitar seu funcionamento nesta nova condição, tais como, um sistema de bombas capazes de impulsionar a fase móvel em volumes menores e de forma constante, um sistema de injeção caracterizado por ciclos de injeção com um curto intervalo de tempo, com pequenos volumes de injeção e que reduza o efeito de memória, e um detector capaz de operar com uma alta taxa de aquisição.

Para a transferência de um método isocrático de um sistema de HPLC para um de UHPLC, os parâmetros a serem otimizados são o volume de injeção e a vazão da fase móvel que podem ser calculados pelas equações 3 e 4 ou em programas desenvolvidos e disponíveis comercialmente¹¹⁶.

A redução no volume de injeção promove uma melhora na forma e resolução das bandas cromatográficas, além de diminuir o efeito de memória no sistema de injeção (Fig. 1.11)

$$V_{inj2} = V_{inj1} \times \frac{d_{c2}^2}{d_{c1}^2} \times \frac{L_1}{L_2} \quad (3)$$

onde, V_{inj2} = volume de injeção a ser determinado, V_{inj1} = volume de injeção do método desenvolvido, d_{c2} = diâmetro interno da coluna a ser empregada, d_{c1} = diâmetro interno da coluna empregada no método desenvolvido, L_2 = comprimento da coluna a ser empregada e L_1 = comprimento da coluna empregada no método desenvolvido.

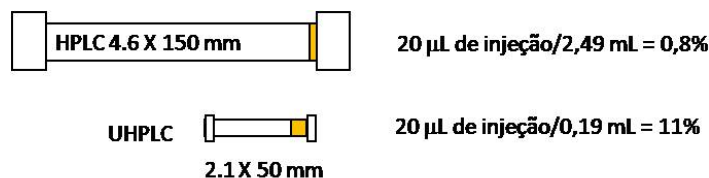


Figura 1.11 Representação esquemática dos volumes de injeção em coluna de HPLC e UHPLC

$$F_2 = F_1 X \frac{d_{c2}^2}{d_{c1}^2} X \frac{d_{p1}}{d_{p2}} \quad (4)$$

Onde, F_2 = vazão da fase móvel a ser determinada, F_1 = vazão da fase móvel do método desenvolvido, d_{p1} = diâmetro de partícula da fase estacionária empregada no método desenvolvido e d_{p2} = diâmetro de partícula da fase móvel a ser empregada.

Já no modo gradiente de eluição, durante a transferência do método, deve-se levar em conta que a fase estacionária deve ser similar a usada no método já existente e, a composição inicial e final do gradiente deve permanecer constante. O tempo da etapa isocrática do gradiente e o tempo do gradiente podem ser calculados pelas equações 5 e 6 respectivamente.

$$t_{iso2} = t_{iso1} X \frac{F_1}{F_2} X \frac{V_{m1}}{V_{m2}} \quad (5)$$

Onde t = tempo, V_{m2} = volume de retardamento da fase móvel a ser empregado e V_{m1} = volume de retardamento da FM empregado no método desenvolvido.

$$t_{grad2} = \frac{(\%B_{final} - \%B_{inicial})}{slope_2} \quad (6)$$

Onde, %B = porcentagem do solvente orgânico e

$$slope_2 = slope_1 X \frac{V_{m1}}{V_{m2}} X \frac{F_2}{F_1} \quad (7)$$

O trabalho desenvolvido por Jastrebova *et al* na determinação de folatos ¹¹⁷ ilustra a otimização do gradiente em ambos os sistemas (HPLC e UHPLC)

utilizando como fase móvel uma mistura de tampão fosfato de potássio 30 mol/L, pH 2,3 e acetonitrila (Fig. 1.12).

De Villiers *et al*¹¹⁸ avaliaram as possibilidades práticas e limitações da técnica do uso do UHPLC em comparação com HPLC através do modelo proposto pela equação de van Deemter. Os resultados foram avaliados de forma a obter uma análise rápida, com eficiência maior se comparado com a técnica de HPLC. As colunas Acquity BEH 1,7 μ m apresentaram ótima velocidade linear ($\sim 0,37$ cm/s) e valores mínimos de altura de pratos ($\sim 4,4$ μ m) comprovando que, partículas de diâmetros menores fornecem maiores eficiências, com o aumento das velocidades lineares da fase móvel.

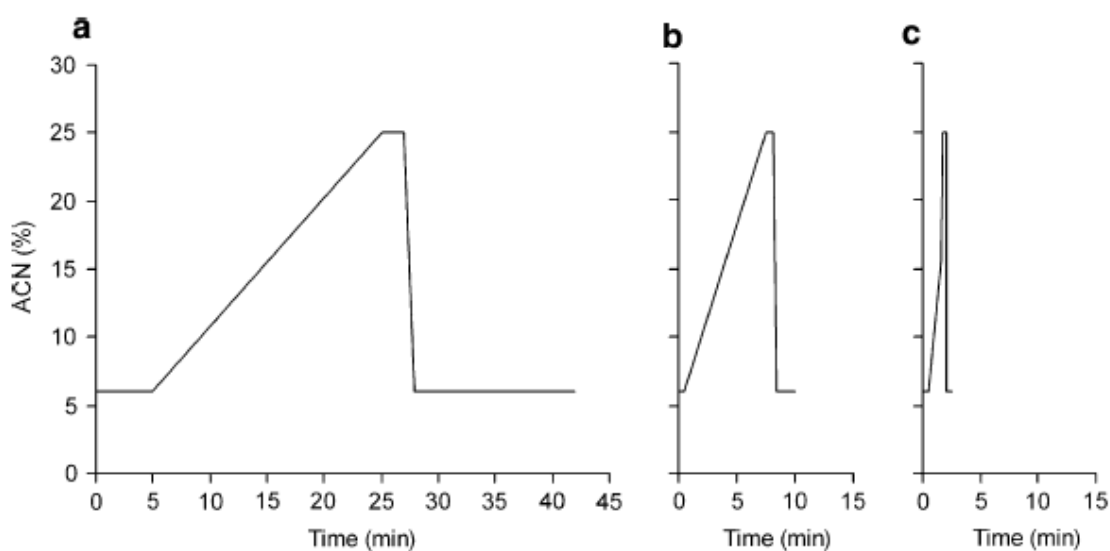


Figura 1.12: Gradiente utilizado para a separação de folatos: a) HPLC, 23⁰C, vazão 0,4 mL min⁻¹ b) UHPLC, 30⁰C, vazão 0,5 mL min⁻¹ c) UHPLC, 60⁰C, vazão 0,7 mL min⁻¹ 117.

As transferências de métodos desenvolvidos em sistemas HPLC para UHPLC ganharam cada vez mais importância, pois o incremento em eficiência e velocidade se tornou fator importante especialmente em análises farmacêuticas, toxicológicas e clínicas em que há uma preocupação no aumento do número de análises e redução dos custos.

Nováková e colaboradores¹¹⁹ fizeram a comparação entre as análises realizadas nos dois sistemas para quatro formulações de uso tópico. Houve redução no tempo de análise de 4,7 a 6,9 vezes com uma diminuição no consumo de

solvente de 5,6 a 8,5 vezes para sistema UHPLC. Além da redução no tempo destinado ao desenvolvimento do método analítico e condicionamento ou recondicionamento da coluna no caso de eluição gradiente.

Uma variedade de métodos para a quantificação de fármacos como resíduos em leite é reportada na literatura. A sua maioria usualmente fazem o uso da detecção por espectrometria de massas. A Tabela 1.8 apresenta exemplos de aplicações.

Tabela 1.8: Limite de quantificação encontrados para antibióticos em leite

Métodos	Fármacos/ metabólitos	Limite de quantificação (mg/L)	Tempo de análise (min)	Referência
UHPLC-MS/MS	Abamectina, ivermectina, doramectina e eprinomectina	0,17 – 2,27	3,5	120
UHPLC-MS/MS	Clembuterol, clorafenicol e dietilestilbestrol	0,02 – 0,13	7	121
UHPLC-MS/MS	Amoxicilina, penincilina G e metabólitos	2,5 – 5	8	122
UHPLC-MS/MS	21 resíduos de fármacos veterinários	—	3	123
UHPLC-MS/MS	38 fármacos anti-helmínticos (benzoimidazoles, avermectinas e fluquicidas)	—	13	124
UHPLC-MS/MS	β -agonistas	0,03-0,21	5	125
UHPLC-MS/MS	Clembuterol, salbutamol e ractopamina	0,009 –0,058	6	126

Continuação da tabela 1.8

UHPLC-TOF-MS	150 resíduos de fármacos veterinários	—	9	30
UHPLC-MS/MS	27 analitos - antocianinas e flavonoides	1 – 100* 30 – 1000**	10	127
UHPLC-MS/MS	13 resíduos - benzoimidazólicos	0,1 – 1	8	128
UHPLC-ToF-MS	100 resíduos – benzoimidazoles, macrolídeos, penicilinas, quinolonas, sulfonamidas, pirimidinas, tetraciclina, nitroimidazoles	—	10	129
UHPLC-MS/MS	13 diuréticos	0,5 – 5	13	130
UHPLC-MS/MS	22 quinolonas	0,008 – 0,339	15	131
UHPLC-MS/MS	17 glucocorticóides	0,04 – 1,27	19	132

*analitos glicosilados **agliconas

OBJETIVOS

Objetivos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

1- Preparo de diferentes colunas de acesso restrito e avaliação da eficiência das mesmas para a exclusão das proteínas presentes no leite bovino

2- O desenvolvimento de métodos para a quantificação dos fármacos amoxicilina e ampicilina em leite bovino, através do emprego da cromatografia líquida de alta e ultra-eficiência, no modo multidimensional.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Procedimento Experimental

3.1 - Generalidades

As análises cromatográficas foram realizadas em dois sistemas

Sistema 1: Cromatógrafo a líquido com duas bombas SHIMADZU LC-10 AD VP (Kyoto, Japan), sendo uma delas acoplada a uma válvula seletora de solvente SHIMADZU FCV-10AL para gradiente de baixa pressão, um detector de ultravioleta de comprimento de onda variável SHIMADZU SPD-M10 AV VP, um auto-injetor SHIMADZU SIL 10 AD VP, um degaseificador modelo DGU-14A, forno CTO 10A (a 30⁰C) e uma interface SHIMADZU SCL 10 AVP. Para o acoplamento das colunas foi utilizada uma válvula de três caminhos VALCO NITRONIC 7000 EA (Supelco, St. Louis, MO) e os cromatogramas registrados através do software Shimadzu-LCsolution (LCsolution 2.1).

Sistema 2: Cromatógrafo a líquido de ultra eficiência Waters ACQUITY UPLC (Milford, USA), especialmente configurado em 2D e composto por uma bomba binária (BSM) e uma quaternária (QSM), com injetor automático Waters 2777C, acoplado a um Waters XEVO TQ-MS.

Empacotadora SHANDON para o empacotamento das colunas cromatográficas.

A água utilizada na composição das fases móveis e preparação de soluções foi purificada por um sistema MILLI-Q (Millipore, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

A homogeneização de todas as amostras foi efetuada em um vórtex PHOENIX AP56.

Para a pesagem dos reagentes foi utilizada uma balança analítica AND (Tóquio, Japão), modelo HR200, com precisão $\pm 0,0001$ g.

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 Ag/AgCl. A calibração do pHmetro foi realizada com solução tampão pH 4,00 e 7,00 (CHEMIS).

As micropipetas utilizadas no preparo das amostras foram GILSON (Middleton, EUA).

Os demais reagentes e produtos químicos utilizados foram obtidos de diversas fontes: Sigma-Aldrich (St Louis, EUA), Merck (Darmstadt, Alemanha), Acros (St Louis, EUA) e Synth (Diadema, SP, Brasil).

Durante todo o desenvolvimento e validação dos métodos analíticos foram utilizados padrões dos fármacos amoxicilina e ampicilina doados pela EMS (Campinas, SP, Brasil).

O leite bovino pasteurizado e homogeneizado utilizado para análise foi adquirido no comércio de São Carlos, SP. Já o leite cru foi gentilmente doado pela Embrapa Agropecuária Sudeste (São Carlos, SP, Brasil).

3.2 - Preparo das Colunas de Proteína Imobilizada

3.2.1- Sílicas Utilizadas

As sílicas utilizadas para o empacotamento das colunas foram: Octilsílica, LUNA-Phenomenex[®] (100 Å, 10 µm); octadecil LUNA-Phenomenex[®] (100Å, 10µm); sílica modificada ácido sulfônico (SCX) NUCLEOSIL (100 Å, 5 µm); e sílica modificada amônia quaternária (SAX) NUCLEOSIL (100Å, 5µm) da Macherey-Nagel.

3.2.2 - Colunas Analíticas Utilizadas

Foram preparadas no laboratório colunas analíticas e para imobilização de proteínas seguiu-se o protocolo estabelecido⁹⁰. As sílicas foram suspensas com 50 mL de metanol, homogeneizadas em ultra-som durante 3 minutos e empacotadas em colunas de aço inoxidável (50 × 4,6 mm e 30 × 2,1 mm). As colunas foram condicionadas em metanol durante aproximadamente 24 horas a uma vazão de 1mL/min.

A coluna analítica de UHPLC ACQUITY UPLC BEH C18 (50 × 2,1mm, 1,7 µm) foi adquirida da Waters.

3.2.3 - Preparo das colunas RAM

Para o preparo das colunas de meio de acesso restrito seguiu-se o procedimento estabelecido no Laboratório de Síntese Orgânica e CLAE do Departamento de Química da UFSCar⁹⁹, baseado no protocolo de Menezes e Felix⁸⁵.

Após o empacotamento das fases hidrofóbicas e de troca iônica, estas foram eluídas, a uma vazão de 1,0 mL/min, com solução tampão KH_2PO_4 (0,05 mol/L; pH 6,0) durante 20 min; em seguida, solução protéica 1,0 mg/mL preparada em solução tampão KH_2PO_4 (0,05 mol/L; pH 6,0) durante 30 min e água por 20 min. E, posteriormente, eluíram-se duas frações de glutaraldeído a 25% (v/v). Após repouso de 12 horas, uma solução de boroidreto de sódio 1,0 mg/mL foi eluída pela coluna até a obtenção de um eluato com valor de pH 10. Após mais 2 horas em repouso, a fase estacionária foi lavada com água durante 30 min e armazenada em geladeira a 4°C.

O método de Bradford¹³³ foi usado para avaliar a eficiência de exclusão das proteínas do leite bovino pelas colunas RAM preparadas.

3.3 - Determinação da exclusão de Proteínas pelas colunas RAM preparadas pelo método de Bradford.

A solução do corante “Coomassie Brilliant Blue” foi preparada na concentração de 1,0 mg/mL, segundo procedimento descrito por Bradford¹³³. Em um béquer dissolveram-se 25 mg do corante em 25 mL de metanol e a seguir acrescentaram-se 50 mL de ácido fosfórico. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 250 mL e completou-se o volume com água Milli-Q. A solução do corante foi estocada em frasco de vidro âmbar.

Em seguida, a coluna RAM foi condicionada com água a 1,0 mL/min. Posteriormente, injetaram-se 50 μL de leite bovino desnatado, eluiu-se com água e coletaram-se a primeira e a segunda fração em dois balões volumétricos de 2 mL. Em seguida, eluiu-se uma solução de limpeza composta de ACN:H₂O:2-propanol (75:15:10 v/v) por 10 min e a coluna foi condicionada com água para a próxima injeção. Este procedimento foi repetido para os volumes de injeção de 100 e 200 μL . Todos os volumes foram coletados em triplicata e posteriormente analisados.

As soluções de referências, não eluídas pela coluna RAM, foram preparadas pipetando-se os volumes de 50, 100 e 200 μL de leite em balões de 2 mL, o volume completado com água e estas analisadas diretamente no UV/Vis. Essas soluções representam 100% das proteínas presentes no leite bovino.

Para determinação das proteínas totais excluídas, pipetaram-se 350 μL dos eluatos, adicionaram-se 3 mL da solução corante e agitou-se por 3 min. Esta solução foi então transferida para uma cubeta de plástico e os valores de absorvância medidos no comprimento de onda de 595nm, relativo ao máximo de absorção do complexo proteína-corante. O mesmo procedimento foi repetido para as soluções preparadas com os eluatos bem como aquelas com soluções padrão de leite.

O cálculo de eficiência de extração foi obtido através da relação entre os valores de absorvância das soluções padrão, este sendo o 100%, e aqueles obtidos pelas soluções dos eluatos das colunas RAM.

3.4 - Desenvolvimento dos métodos analíticos

Dois diferentes métodos foram desenvolvidos, um para a detecção simultânea de amoxicilina e ampicilina por LC-LC-UV/Vis e outro por (LC-UHPLC-MS/MS) para quantificação da ampicilina.

Para a curva de calibração com detecção por UV/Vis, foi preparada uma solução combinada que continha os antibióticos amoxicilina e ampicilina na concentração de 2 mg/mL através da dissolução de 50 mg de cada um dos fármacos em um volume final de 25 mL de água. Foram então preparadas soluções intermediárias nas concentrações de 25, 50, 100, 200, 400 e 600 $\mu\text{g/mL}$. E as soluções de calibração preparadas através da combinação de 100 μL dessas soluções com 900 μL de leite, homogeneizados em vortex por 10 segundos. Alíquotas de 700 μL foram transferidas para os *vials* do auto-injetor e injetou-se um volume de 100 μL . As concentrações utilizadas para a curva analítica foram: 2,5; 5; 10; 20; 40 e 60 $\mu\text{g/mL}$.

Para a validação do método por detecção no espectrômetro de massas a solução estoque, de ampicilina, foi preparada na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ através da dissolução de 3,12 mg do fármaco em um volume final de 25 mL de

água. Dessa, preparou-se uma solução de 500 ng/mL e a partir desta prepararam-se soluções intermediárias nas concentrações de 15, 30, 45, 60, 100 e 120 ng/mL. As soluções de calibração foram preparadas através da combinação de 100 µL das soluções intermediárias com 900 µL de leite e homogeneizados em vortex por 10 segundos. Alíquotas de 350 µL foram transferidas para os *vials* do auto-injetor e injetou-se um volume de 10 µL. As concentrações utilizadas para a calibração foram 1,5; 3; 4,5; 6; 10 e 12 ng/mL.

Os valores de concentração dos controles de qualidade, 1,8; 7,2 e 9,6 ng/mL foram calculados da seguinte forma:

1. Controle de qualidade de concentração mais baixa em torno de 110 a 120%, em relação ao menor ponto da curva de calibração;
2. Controle de qualidade de concentração média em torno de 40 a 60% em relação ao maior ponto da curva analítica;
3. Controle de qualidade de concentração alta, em torno de 75 a 95% em relação ao maior ponto da curva de calibração.

As curvas analíticas foram obtidas através da regressão linear, considerando a área da banda cromatográfica referente a cada concentração dos compostos. Foi considerado um mínimo de cinco diferentes concentrações em cada curva de calibração. A linearidade foi obtida através do valor do coeficiente de correlação.

Foram otimizadas as condições cromatográficas utilizadas em cada método. As condições adotadas para detecção da amoxicilina e ampicilina por LC-LC-UV/Vis foram:

A uma vazão de 1mL/min, tem-se que na bomba 1:

0-9 min: utilizando como fase móvel tampão formiato de amônia 10 mmol/L, pH 6,0 há a exclusão das proteínas do leite e eluição da amoxicilina pela coluna RAM.

6,2-9 min: Há a transferência da amoxicilina da coluna extratora para a coluna analítica.

9-20 min: Utilizando como fase móvel tampão formiato de amônia 10 mmol/L, pH 6,0: metanol (90:10 v/v) há a eluição da ampicilina pela coluna RAM.

18-21 min: Transferência da ampicilina da coluna extratora para a coluna analítica.

20-25 min: Limpeza da coluna RAM com uma solução de ACN:H₂O:2-propanol (75:15:10 v/v).

25-40 min: Condicionamento da coluna RAM.

A uma vazão de 1 mL/min, no modo isocrático, utilizando como fase móvel tampão formiato de amônia 10 mmol/L pH6,0: MeOH (80:20 v/v), na bomba 2:

10-15 min: Eluição da amoxicilina pela coluna analítica

30-35 min: Eluição da ampicilina pela coluna analítica.

Como coluna extratora, utilizou-se uma coluna RAM-BSA C₈ (50 x 4,6 mm Luna-Phenomenex[®], 10 µm e 100 Å) e analítica C₁₈ (150 x 4,6 mm Luna-Phenomenex[®], 10 µm e 100 Å). Volume de injeção: 200 µL; vazão: 1mL/min em ambas as colunas; λ: 230 nm e T= 30 °C em ambas as colunas.

Já para o método de quantificação da ampicilina utilizando um sistema LC-UHPLC-MS/MS foram utilizadas as seguintes condições:

Com uma vazão de 0,4 mL/min na bomba quaternária:

0-3 min: Utilizando como fase móvel uma mistura H₂O:MeOH (97:3 v/v) houve a exclusão das proteínas do leite pela coluna RAM

3-5 min: Utilizando como fase móvel uma mistura MeOH:Ác. Fórmico (0,1%) variou-se a proporção em um gradiente linear de forma que a porcentagem de orgânico variou de 3 a 70% e há então a eluição da ampicilina pela coluna RAM.

5-6 min: Fase móvel MeOH:Ác. Fórmico (0,1%) (70:30 v/v), transferência da ampicilina da coluna analítica para a coluna extratora.

6-10 min: Limpeza da coluna RAM com uma solução de ACN:H₂O:2-propanol (75:15:10 v/v).

10-14 min: Recondicionamento da coluna RAM.

Com uma vazão de 0,4 mL/min, no modo isocrático de eluição e utilizando como fase móvel MeOH:Ác. Fórmico (0,1%) (70:30 v/v) na bomba binária:

5-9 min: Há a eluição da ampicilina pela coluna analítica.

Como coluna extratora, utilizou-se uma coluna RAM-BSA C₈ (50 x 2,1 mm Luna[®], 10 µm e 100 Å) e analítica ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (50 x 2,1 mm 1,7 µm). Volume de injeção: 10 µL e T= 30 °C na coluna analítica.

3.4.1 - Parâmetros analíticos adotados para a validação de fármacos em matrizes biológicas

3.4.1.1 - Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através de amostras de leite isentas dos compostos. Em cada seqüência de análise procedeu-se a injeção em triplicata das amostras de leite com a adição do analito.

3.4.1.2 – Linearidade

A linearidade foi avaliada de acordo com o coeficiente de correlação (r) obtido pelo método de regressão linear a partir da curva analítica.

3.4.1.3 - Precisão e Exatidão

A precisão intradia e interdia e a exatidão foram avaliadas utilizando-se as amostras controle de qualidade do método, as quais foram preparadas em replicatas (n=5) em leite. A precisão do método foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) das replicatas. A exatidão foi calculada através da razão das médias das concentrações encontradas e o valor médio das concentrações nominais e expressa em porcentagem.

3.4.1.4 - Recuperação

A eficiência de extração dos analitos da matriz biológica foi avaliada utilizando-se as soluções de controle de qualidade, em replicatas (n=5).

O percentual de eficiência de extração das colunas RAM foi calculado por comparação dos resultados obtidos para as soluções controles preparadas em leite, com os obtidos com as soluções controle preparadas em água Milli-Q.

3.4.1.5 - Limite de Quantificação (LQ) e de Detecção (LD)

O LQ foi estabelecido como a menor concentração, cuja precisão, expressa pelo coeficiente de variação (CV%), não excedeu o valor de 20% do valor nominal da concentração. O LD foi estabelecido como a menor concentração que apresentou um sinal três vezes maior que o ruído do detector.

3.4.1.6.- Estabilidade

A estabilidade das amostras foi verificada através da determinação das concentrações das amostras controle de qualidade, preparadas em triplicata por interpolação com a curva de calibração. A precisão e exatidão obtidas nestas análises determinaram a estabilidade das amostras, onde foram consideradas estáveis as amostras que apresentaram variabilidade de até 15%, conforme critério de aceitação do método.

a) Estabilidade das amostras após ciclos de gelo e degelo

As amostras de leite fortificadas, recém preparadas, foram analisadas e posteriormente congeladas a -20°C . Após um período de 24 horas, as amostras foram degeladas à temperatura ambiente e novamente analisadas. Este procedimento foi realizado mais duas vezes, sempre com intervalos de 24 horas para cada ciclo.

b) Estudos do efeito de matriz

Soluções contendo separadamente os compostos de interesse na concentração de $4\ \mu\text{g/mL}$ foram infundidas a uma vazão de $10\ \mu\text{L/min}$. As amostras de leite assim como a fase móvel foram injetadas no sistema cromatográfico e a resposta foi monitorada continuamente para produzir um perfil do efeito de matriz.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

4.1 - Avaliação da Eficiência das Colunas RAM quanto a Exclusão das Proteínas do Leite Bovino

Para o desenvolvimento de um método analítico que busca a quantificação de fármacos em matrizes biológicas através da injeção direta em um sistema multidimensional, cromatograficamente, deve-se atentar para dois principais fatores: o material ligado a superfície da sílica que fará a exclusão das macromoléculas presentes na matriz e o grupo responsável pela retenção dos analitos de interesse. A perfeita combinação destes fatores resulta em um método eficiente, seletivo, preciso e exato. Seguindo esta direção, buscou-se uma comparação entre os diferentes materiais ligados a superfície da sílica, proteínas (BSA e β -lactoglobulina) e polímeros (metilcelulose), bem como o material presente no interior dos poros, C_8 , SCX (*strong cation exchange*) e SAX (*strong anion exchange*). A Figura 4.1 apresenta um esquema com as diferentes combinações propostas neste trabalho.

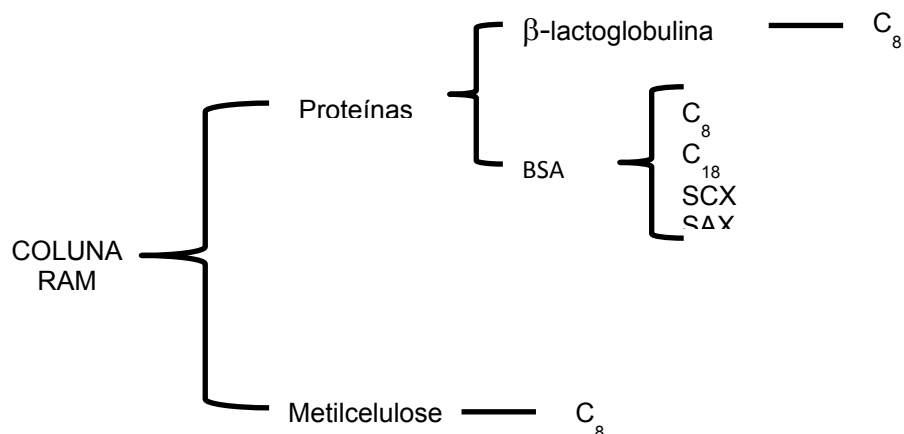
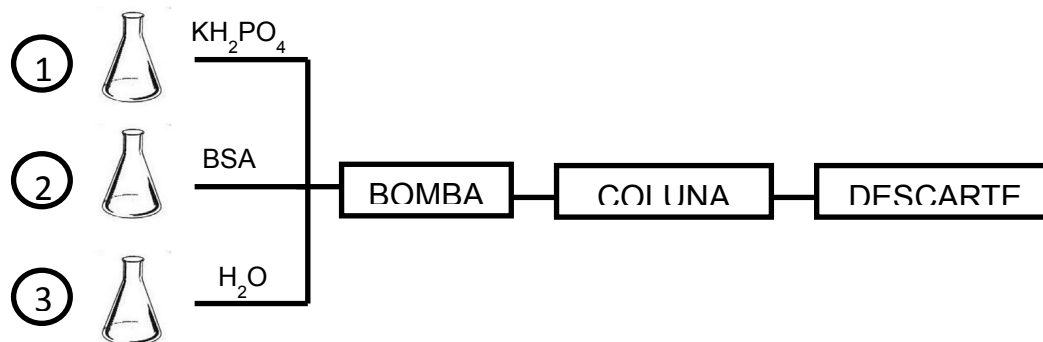


Figura 4.1: Representação esquemática das diferentes colunas de meio de acesso restrito utilizadas neste trabalho

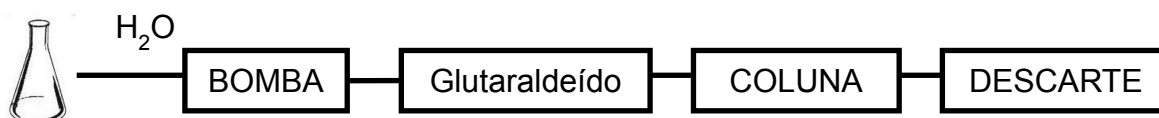
Para as colunas do tipo RAM, de fase hidrofóbica ou de troca iônica selecionadas foram previamente empacotadas conforme o protocolo do Laboratório de Síntese Orgânica e CLAE do DQ-UFSCar e as fases do tipo RAM-BSA e RAM - β -lactoglobulina foram posteriormente preparadas conforme protocolo descrito por

Menezes e Félix⁸⁵, representado esquematicamente na Figura 4.2. A coluna RAM de metilcelulose é comercial e foi doada pela Shimadzu Brasil (Shimpack MAYIC8[®])

Imobilização da BSA



Formação de Bases de Schiff



Redução de iminas e grupos aldeídos residuais

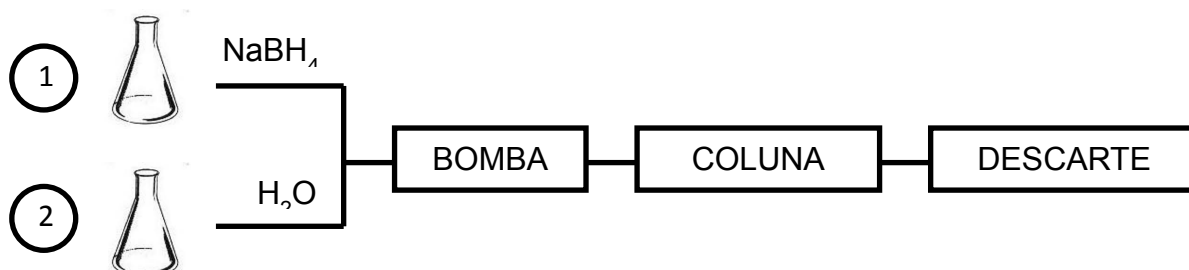


Figura 4.2 Esquema representativo das etapas envolvidas no preparo das colunas RAM¹³⁴.

Baseado no trabalho de Tanaka *et al.*¹³⁵, que investigou a eficiência da exclusão de proteínas do soro humano por uma coluna RAM-avidina, o ensaio colorimétrico selecionado para avaliar a eficiência de exclusão protéica das colunas RAM foi o de Bradford¹³³ que utiliza o corante Coomassie Brilliant Blue G250. O ensaio é baseado no deslocamento do máximo de absorvância do corante de 465 para 595 nm¹³⁶ devido as interações eletrostáticas e hidrofóbicas¹³⁷ entre o corante

que, na sua forma aniônica, se liga aos resíduos de aminoácidos básicos ou aromáticos das proteínas (de forma preferencial aos resíduos de arginina). Este complexo proteína-corante possui máximo de absorção no comprimento de onda de 595 nm.

A Figura 4.3 ilustra o procedimento experimental descrito anteriormente para as medidas de exclusão das proteínas do leite bovino pelas colunas RAM.

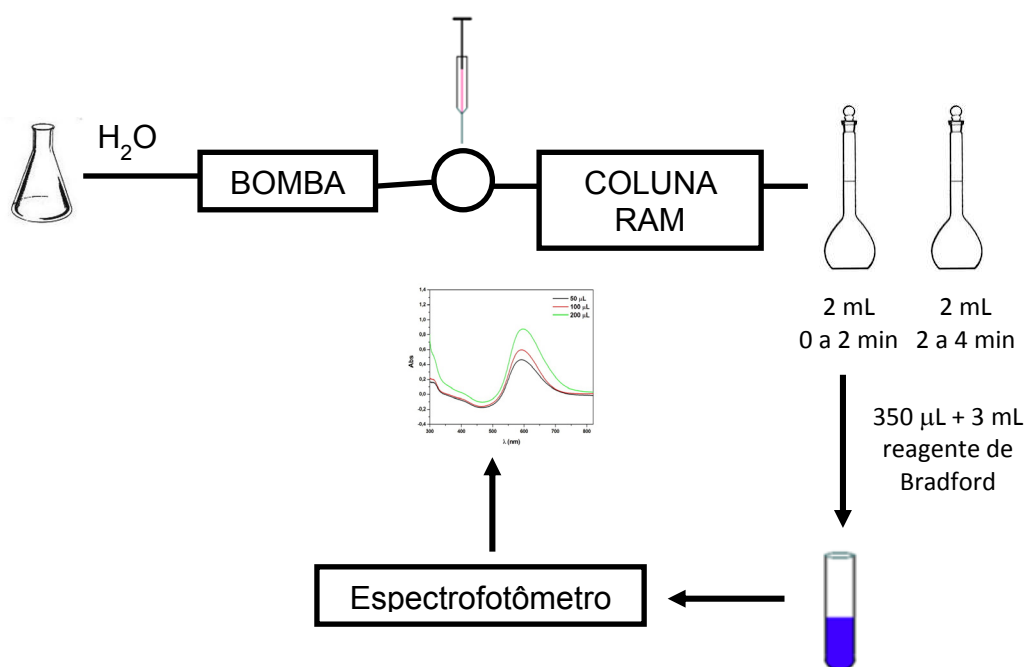


Figura 4.3: Procedimento utilizado para avaliar a eficiência de exclusão proteica pelas colunas RAM. Adaptado da referência¹³⁴

Na Figura 4.4 é apresentado o espectro de absorção no ultravioleta correspondente a primeira fração de leite bovino eluído pela coluna RAM β-lactoglobulina, para os volumes de 50, 100 e 200 µL. A formação do complexo proteína-corante pode ser observada em todos os espectros a 595 nm.

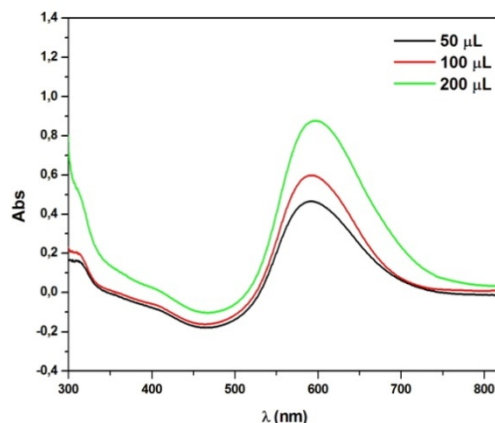


Figura 4.4: Espectros de UV/Vis correspondentes ao complexo proteína-corante da primeira fração (2mL) de leite bovino eluído pela coluna RAM β-lactoglobulina (50 × 4,6mm; 100 Å, 10mm) para os volumes de 50, 100 e 200 µL de leite.

A avaliação da eficiência da exclusão das proteínas pelas colunas de meio de acesso restrito foi calculada através da comparação da intensidade das absorvâncias relativas ao complexo proteína-corante (em 595 nm) das soluções padrão de leite que não eluíram pela coluna RAM (que fornecem a quantidade total de proteína no leite) com as frações de leite eluídas pelas colunas RAM. Na Figura 4.5 são apresentados os percentuais de exclusão de proteínas do leite para as colunas RAM avaliadas.

De acordo com os dados obtidos, pode-se verificar que, em média, o poder de exclusão para as colunas em estudo é de 90% (Figura 4.5). A segunda fração de eluato coletada após os dois primeiros minutos não mostrou a presença de proteínas. Assim, as proteínas que não foram excluídas podem estar adsorvidas no suporte cromatográfico, acumuladas nos filtros das colunas¹³⁸ ou estão presentes no eluato em uma baixa concentração, não podendo assim ser mensurada pelo método de Bradford.

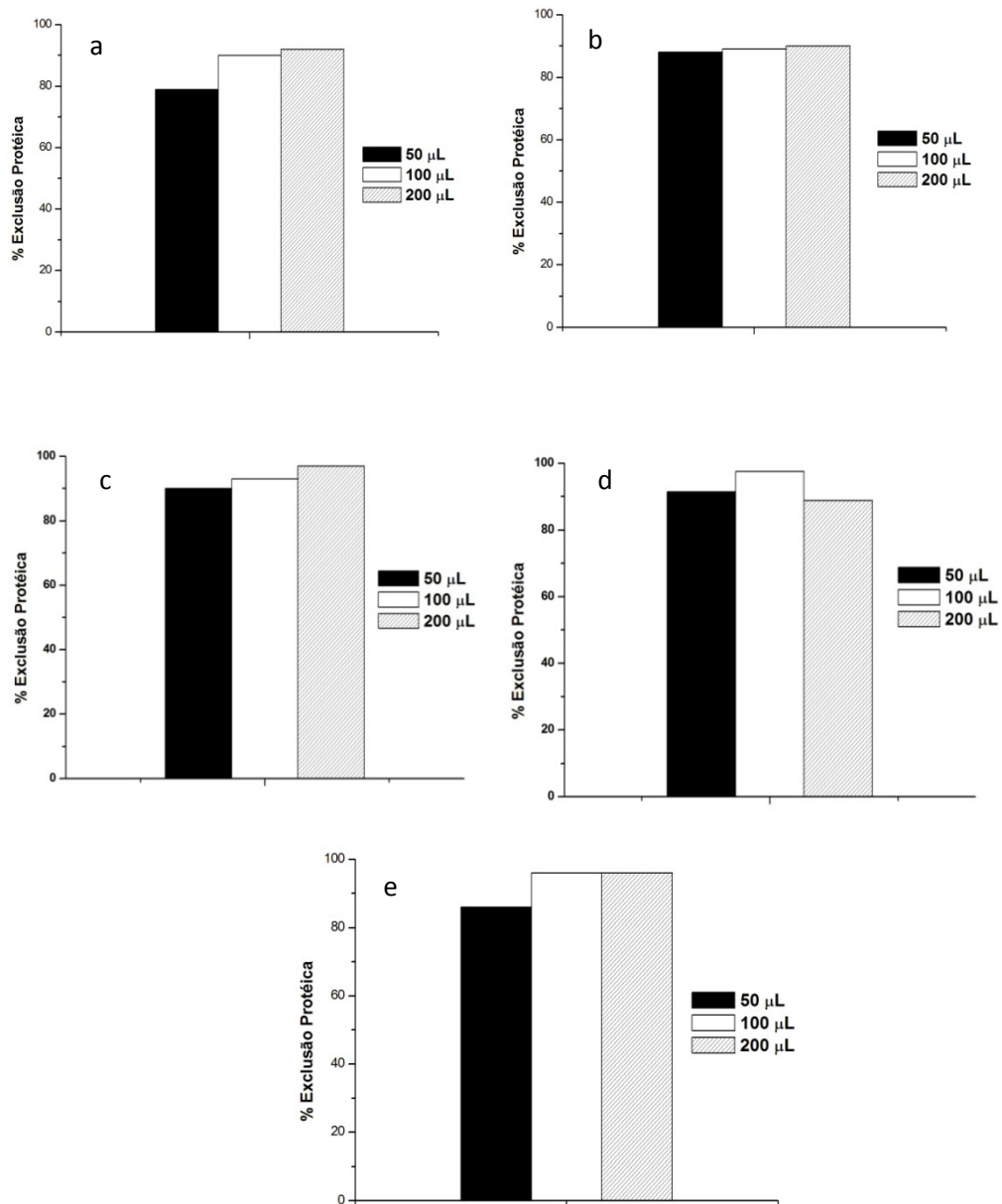


Figura 4.5: Porcentagem de proteínas excluídas pelas colunas RAM (a) BSA SCX (b) BSA SAX (c) BSA C₈ (d) β -lactoglobulina C₈ (e) MAYIC₈ Shimadzu.

Isto pôde ser comprovado através dos primeiros experimentos para a avaliação da eficiência quanto à exclusão realizados com as colunas RAM-BSA de troca iônica. Da primeira fração referente aos dois primeiros minutos após a injeção de leite bovino desnatado pela coluna RAM-BSA, foi coletada uma alíquota de 350 μL que reagiu com 5 mL de reagente de Bradford. Foram obtidos baixos valores de porcentagem de exclusão das proteínas para os menores volumes de injeção (50 e 100 μL).

O mesmo experimento foi realizado, porém recolhendo-se uma alíquota maior (500 μ L) que reagiu com um volume menor, 3 mL, de reagente de Bradford. A porcentagem de exclusão foi maior que 80% para os três volumes de injeção (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Avaliação da eficiência de exclusão protéica em colunas RAM-BSA SACX com diferentes volumes de reagente colorimétrico

Volume de injeção (μ L)	Volume de Reagente de Bradford	
	5 mL	3 mL
50	30,4%	87,9%
100	36,4%	88,6%
200	80,5%	84,0%

Logo, pode-se concluir que quando se utiliza uma grande quantidade do reagente de Bradford para reagir com um pequeno volume de eluato, a diluição das proteínas do leite dificulta a detecção do complexo corante-proteína.

4.2 - Avaliação da Capacidade de Retenção dos Antibióticos pelas Colunas RAM-BSA de Troca Catiônica.

Os grandes avanços obtidos no preparo de amostras através do uso de colunas de meio de acesso restrito possibilitaram o desenvolvimento da técnica de injeção direta de amostras, que permitem fazer a exclusão de proteínas e outras macromoléculas presentes na matriz biológica e a extração de analitos de menor massa molecular através de interações hidrofóbicas, iônicas ou afinidade ¹³⁹.

As colunas de meio de acesso restrito de troca iônica foram desenvolvidas com o objetivo de superar problemas relacionados à retenção de compostos altamente hidrofílicos e polares observados com o emprego das colunas de fase reversa. Além disso, mostram boa seletividade devido a natureza dos grupos trocadores imobilizados já que apenas compostos carregados podem ser retidos.

Uma fase estacionária trocadora iônica pode conter grupos negativamente carregados em sua superfície e estes agir como trocadores

catiônicos ou então conter grupos positivamente carregados e então agir como trocadores aniônicos.

O processo de troca iônica requer a competição entre o contra-íon e os íons presentes na amostra pelos sítios carregados da fase estacionária (Figura 4.6).

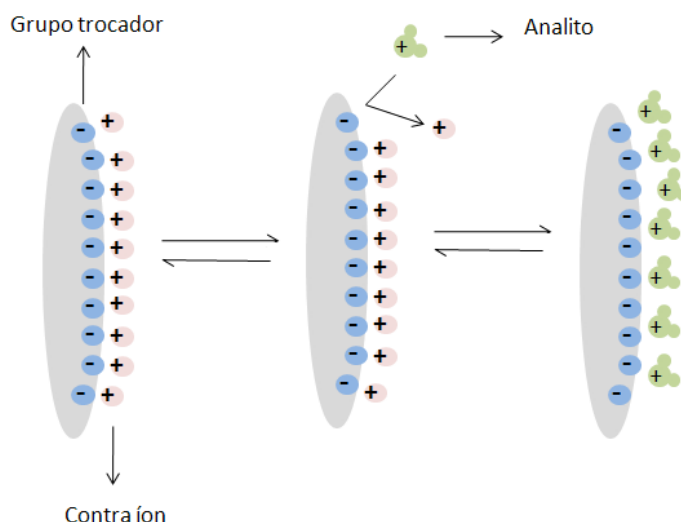


Figura 4.6: Representação do processo de troca catiônica que requer a competição entre o contra-íon e os íons presentes nas amostras pelos sítios carregados da fase estacionária.

Dessa forma, a interação do analito com a fase estacionária desloca o contra-íon de sua superfície para a fase móvel e este é então retido. Se ambos, analito e contra-íon são monovalentes, então o equilíbrio envolvido pode ser representado pela seguinte equação:



Sendo que, FE representa a fase estacionária, C o contra-íon e A o analito a ser retido no suporte cromatográfico. Valores de pH e da concentração do contra-íon governam fatores como retenção e seletividade ¹⁴⁰.

As colunas RAM de troca iônica foram inicialmente produzidas pela Merck no ano de 2001 (LiChrospher XDS phase), uma sílica porosa de 25 μm (diâmetro do poro 6 nm) com superfície externa recoberta de grupamentos dióis e parte interna contendo grupos sulfônicos ácidos (SO₃⁻), o que as caracterizam como trocadores catiônicos fortes (SCX, *strong cation exchange*). Devido ao tamanho dos poros não é possível que macromoléculas tenham acesso interno e o revestimento

presente na superfície faz com que estas também não sejam adsorvidas e dessa forma são excluídas pela coluna. Já os analitos de baixa massa molecular (massas menores que aproximadamente 15 kDa) têm livre acesso aos poros e são retidos através de interações eletrostáticas. São colunas usadas por Boos e colaboradores para análise em plasma de compostos básicos, tais como solatol e atropina ^{141,142}.

Além dos grupamentos dióis, a metilcelulose (MC) foi um novo material covalentemente ligado na superfície externa de um suporte de sílica gel internamente modificado por grupamentos trocadores catiônicos fortes (MC-SCX), 2-(4-sulfofenil)etil, desenvolvido por Yamamoto e colaboradores ¹⁴³, utilizado inicialmente para estudos farmacocinéticos dos fármacos catiônicos piridoxina, atenolol e sulpirida com detecção por UV, e posteriormente para os compostos básicos como clomipramina entre outros em plasma, com detecção por espectrometria de massas ¹⁴⁴.

Com grupamentos trimetil amônia derivados na superfície interna de partículas MC-sílica, o que as caracteriza como trocadoras aniônicas fortes, as colunas RAM comercializadas com o nome de Shim-pack MAYI-SAX (Shimadzu) são utilizadas no pré tratamento de amostras, para estudo farmacocinético, através da extração *on line* de compostos aniônicos, tais como aspirina e seus três metabólitos em plasma de ratos ¹⁴⁵.

Além das colunas SCX e SAX, Yamamoto e colaboradores desenvolveram um trabalho para a determinação de fármacos com características básicas tais como sulpirida, quinidina, ranitidina e desipramina em plasma utilizando na primeira dimensão de um sistema multidimensional, com injeção direta de amostras, uma coluna RAM que possui covalentemente ligado em sua superfície externa um polímero de metilcelulose e na superfície interna grupamentos 2-carboxietil (MC-WCX) o que a caracteriza como trocadores catiônicos fracos, *weak cation-exchange* ¹⁴⁶. Já Rbeida *et al.* utilizaram colunas de MC-sílica, que possuem em seu interior grupamentos dietilaminoetil, caracterizados como trocadores aniônicos fraco, *weak anion exchange*, responsáveis pela extração e retenção de compostos hidrofílicos ácidos tais como ácido glutâmico, ácido aspártico, ácido ascórbico, acetilcisteína e cloxacilina em plasma [9, 10].

Cassiano *et al.* escreveram uma revisão que aborda as recentes aplicações de colunas de meio de acesso restrito na injeção direta de amostras em

fluidos biológicos. Entre os diferentes tipos de coluna de meio de acesso restrito estão as colunas RAM-SCX e outros tipos de colunas de troca iônica ¹³⁹.

Neste trabalho, para a determinação de ampicilina e amoxicilina em leite bovino, a escolha de colunas de meio de acesso restrito com RAM BSA-SCX na primeira dimensão foi justificada pelo fato de as colunas RAM mostrarem extrema eficiência para a exclusão de macromoléculas em amostras biológicas, além do que os compostos em estudos mostrarem características hidrofílicas e capacidade de estarem em sua forma ionizada em toda faixa de pH, logo facilmente retidos pelos grupamentos trocadores do suporte cromatográfico.

A amoxicilina possui três valores de pKa (2,6; 7,2 e 9,6) e a ampicilina dois valores de pKa (2,6 e 7,4). Possuem uma amina primária, uma secundária e outra terciária e suas estruturas estão representadas na Figura 4.7.

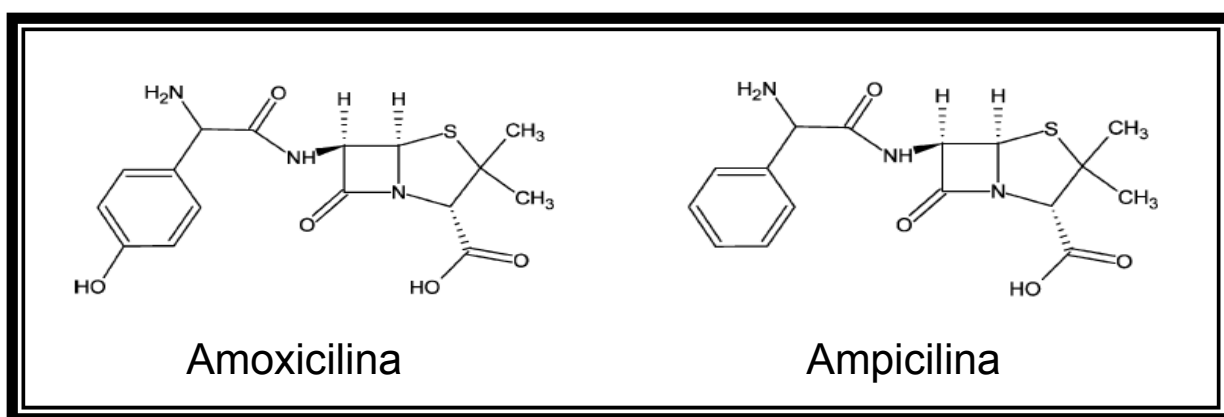


Figura 4.7: Representação estrutural dos antibióticos β -lactâmicos: amoxicilina e ampicilina

A primeira coluna avaliada foi a coluna RAM-BSA de troca catiônica SCX Nucleosil (100-S 5A 50 \times 4,6mm 5 μ m) que possui em seus poros grupos benzenossulfônicos (Fig. 4.8). A retenção dos analitos catiônicos é esperada devido à interação eletrostática com grupos os ácidos sulfônicos ligados ao interior dos poros.

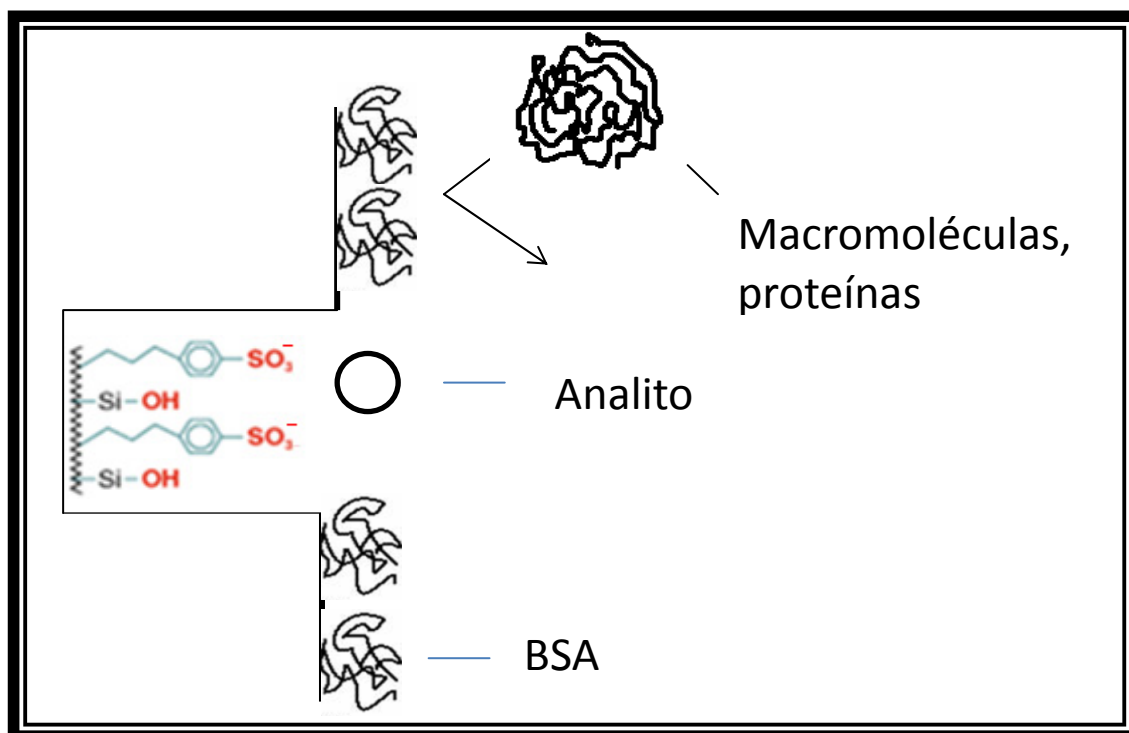


Figura 4.7: Fase trocadora de cátions recoberta com albumina sérica bovina

O estudo da retenção neste tipo de material consiste na determinação do perfil de eluição de cada composto com diferentes fases móveis.

Como fase móvel, foram utilizados, ácido fórmico, ácido acético, tampão formiato de amônia e TFA em diferentes concentrações e valores de pH. Injetou-se padrão de amoxicilina e ampicilina em água na concentração de 100 µg/mL, a uma vazão de 1 mL/min, temperatura do forno de 30⁰C, com detecção em 230 nm.

Porém, os cromatogramas obtidos foram semelhantes, tanto no tempo de retenção quanto no perfil das bandas cromatográficas.

Como exemplo, a Figura 4.9 ilustra os cromatogramas da amoxicilina utilizando diferentes concentrações de ácido fórmico. É possível observar que há grande semelhança entre os cromatogramas, para as diferentes concentrações (2,5 e 50 mmol/L) de ácido fórmico. Para a ampicilina foi observado perfil similar.

Com o objetivo de estudar a influência da BSA na retenção dos compostos em estudo fez-se então o empacotamento de uma coluna de troca catiônica SCX Nucleosil (100-S 5A 50 × 4,6 mm; 5 mm).

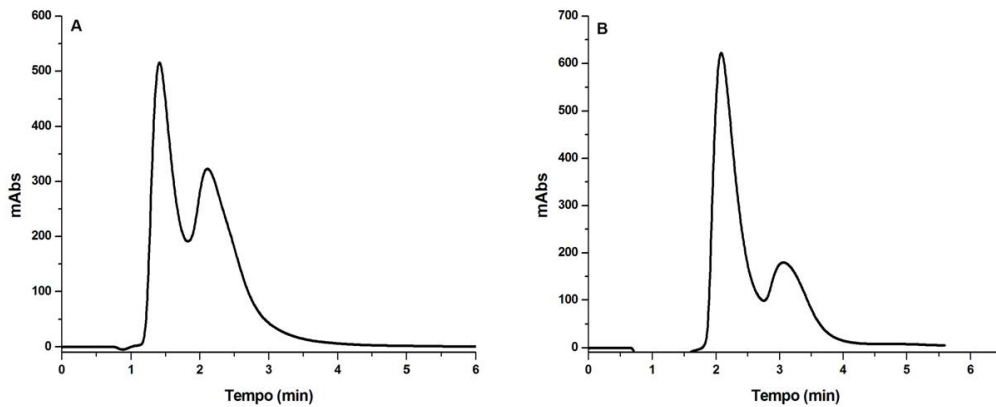


Figura 4.8: Cromatogramas referentes a injeção de amoxicilina 100 $\mu\text{g/mL}$. Utilizando com fase móvel ácido fórmico (A) 2,5 mmol/L (B) 50 mmol/L a uma vazão de 1 mL/min. Temperatura de 30°C. Comprimento de onda de 230 nm. Coluna SCX Nucleosil (100-S 5A 50 x 4,6 mm; 5 μm).

Para a retenção da amoxicilina e ampilina em uma coluna de troca catiônica é necessário que a fase móvel utilizada tenha características ácidas de forma que o grupamento amino primário NH_2 , esteja protonado (Figura 4.10) e assim interaja com os grupamentos negativamente carregados do suporte cromatográfico.

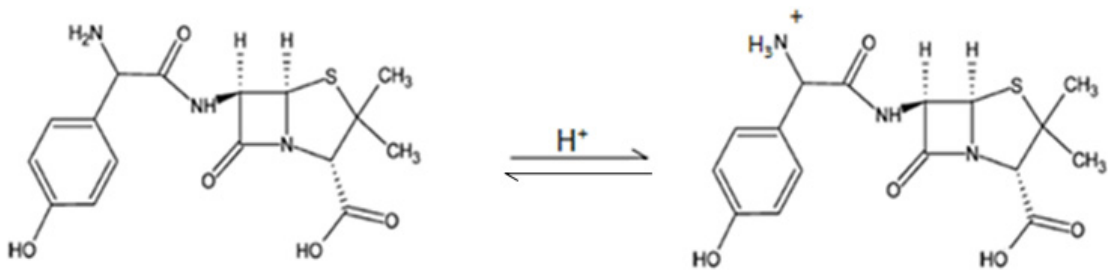


Figura 4.9: Equilíbrio químico para a amoxicilina em condições ácidas

Dessa forma, utilizou-se como fase móvel tampão formiato de sódio, variando-se o pH (2,5; 3,0; 3,5 e 4,0) e a concentração de sais (5, 10 e 30 mmol/L). Para exemplificar, os cromatogramas para a amoxicilina estão apresentados na Figura 4.11.

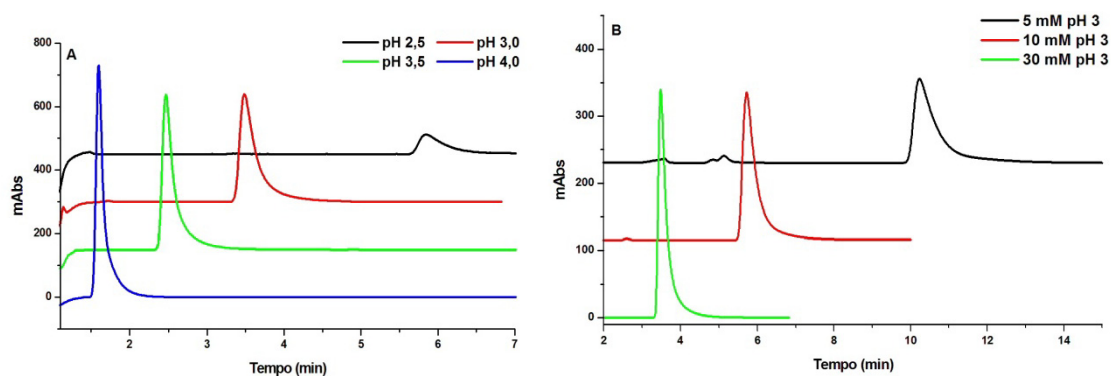


Figura 4.10: Cromatogramas referentes a injeção de amoxicilina 100 $\mu\text{g/mL}$, utilizando com fase móvel formiato de sódio através da variação de (A) pH (B) concentração, a uma vazão de 1 mL/min. Temperatura de 30^o C. Comprimento de onda de 230 nm. Coluna SCX Nucleosil (100-S 5A 50 x 4,6 mm; 5 μm).

Em cada experimento, o fator de retenção (k), que é uma medida adimensional e fundamental da retenção em cromatografia líquida, definida como a razão entre o número de moléculas do soluto na fase estacionária e o número de moléculas do soluto na fase móvel, foi determinado para cada composto (Equação 9).

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (9)$$

t_R o tempo de retenção do soluto e t_M o tempo de retenção do soluto não retido

A Figura 4.12 ilustra a relação entre o inverso do fator de retenção ($1/k$) para a amoxicilina e ampicilina como uma função da variação de pH. A retenção dos analitos aumenta em fases móveis mais ácidas, devido a uma maior ionização dos grupamentos amina.

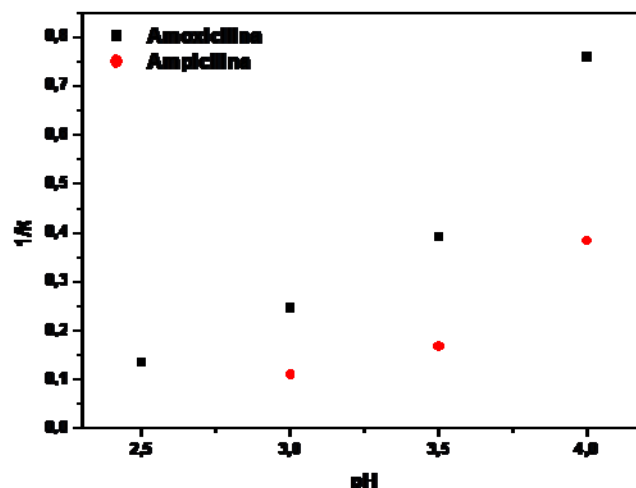


Figura 4.11: Capacidade de retenção dos trocadores catiônicos frente aos analitos amoxicilina e ampicilina variando os valores de pH do formiato de sódio utilizado como fase móvel.

Outro estudo a fim de demonstrar a eficiência da concentração do sal utilizado na composição da fase móvel sobre o tempo de retenção dos compostos encontra-se descrito na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Influência da concentração de formiato de sódio utilizado como fase móvel no fator de retenção (k) dos analitos

Concentração de Formiato de Sódio (mmol/L)	Fator de Retenção (k)	
	Amoxicilina	Ampicilina
5	11,9	37,5
10	6,2	19,4
20	3,4	10,6

Como esperado, um aumento na força iônica da fase móvel causa uma diminuição no fator de retenção dos analitos devido a competição com os íons sódio pelos sítios trocadores.

Pode-se observar, pelos valores de fator de retenção que a ampicilina tem uma maior afinidade pelos trocadores de cátions presentes nos poros da fase estacionária.

Tal resultado se mostra diferente daqueles obtidos com as colunas que possuem proteína BSA imobilizadas em sua superfície. Na coluna RAM-BSA SCX havia a presença de diferentes formas ionizáveis da amoxicilina, além disso, outras interações além das eletrostáticas com os grupos sulfônicos ácidos influenciam a retenção dos compostos em estudo.

Os compostos foram capazes de interagir tanto com as proteínas imobilizadas no suporte cromatográfico como pelo interior dos poros (grupos sulfônicos ácidos). Diferentemente do que acontece com as colunas RAM que possuem em sua superfície grupamentos dióis ou metilcelulose, que se mostraram inertes no processo de retenção dos compostos nelas avaliados.

4.3 - Avaliação da Capacidade de Retenção dos Antibióticos pelas Colunas RAM de fase hidrofóbicas.

Dentre os compostos selecionados como objeto de estudo, a amoxicilina foi anteriormente estudada por Gomes *et al.*⁹⁰ com relação à retenção em colunas RAM-BSA C₁₈ utilizando agente de pareamento iônico na fase móvel já que, devido ao caráter polar destes compostos as análises por cromatografia no modo reverso de eluição são dificultadas.

No modo reverso de eluição quanto maior a hidrofobicidade de um composto, maior será seu tempo de retenção, sendo assim, compostos com características ácidas ou básicas ao serem ionizados não serão retidos ou terão seu tempo de retenção reduzido.

Tanto a amoxicilina como a ampicilina, por serem moléculas anfóteras, estão ionizadas em toda a faixa de pH, sendo assim necessário encontrar um tampão, para ser utilizado como fase móvel, cujo valor de pH e contra-íon sejam capazes de parear com as moléculas em estudos e assim serem retidas pelas colunas RAM C₈.

A primeira coluna de meio de acesso restrito avaliada foi a coluna Shimpack MAYI C₈. Estas possuem como recobrimento de superfície da sílica gel um polímero, metilcelulose, solúvel em água (Figura 4.13)¹⁴⁷.

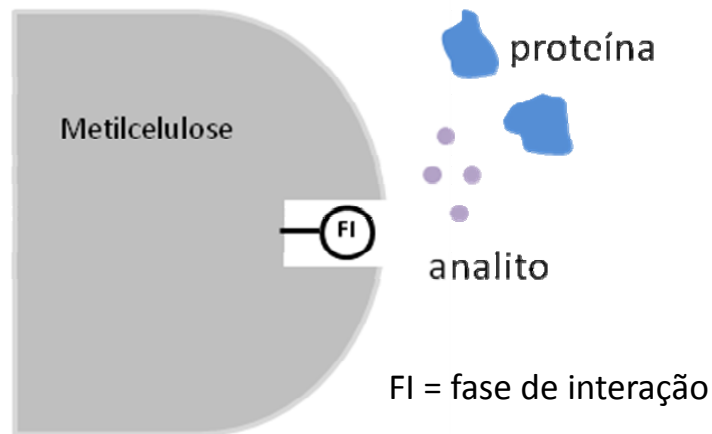


Figura 4.12: Esquema do mecanismo proposto para a exclusão de macromoléculas em coluna MAYI-ODS ¹⁴⁸.

Optou-se pela utilização de um tampão volátil (acetato e formiato de amônia) como fase móvel, já que em água não foi possível reter os analitos de interesse, e também por estes serem utilizados sem restrição quando o detector escolhido é um espectrômetro de massas.

Com o tampão acetato de amônia os compostos eluíram no tempo morto da coluna (Figura 4.14)

Com o tampão formiato de amônia, para a ampicilina, quanto maior o valor do pH, maior foi a sua retenção (Figura 4.15). Para a amoxicilina, não houve retenção em todas as condições estudadas.

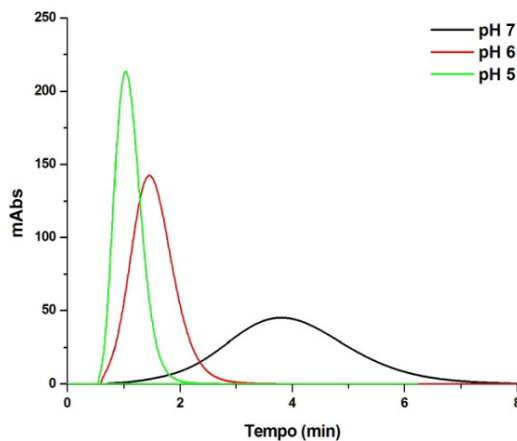


Figura 4.13: Cromatogramas de amostras de ampicilina (50 µg/mL) em solução aquosa utilizando RAM MAYI C₈, com variação do pH da fase móvel. Condições cromatográficas: Fase móvel: Acetato de amônia 10 mmol/L; vazão 1mL/min; volume de injeção 100 µL. Detecção UV 230 nm.

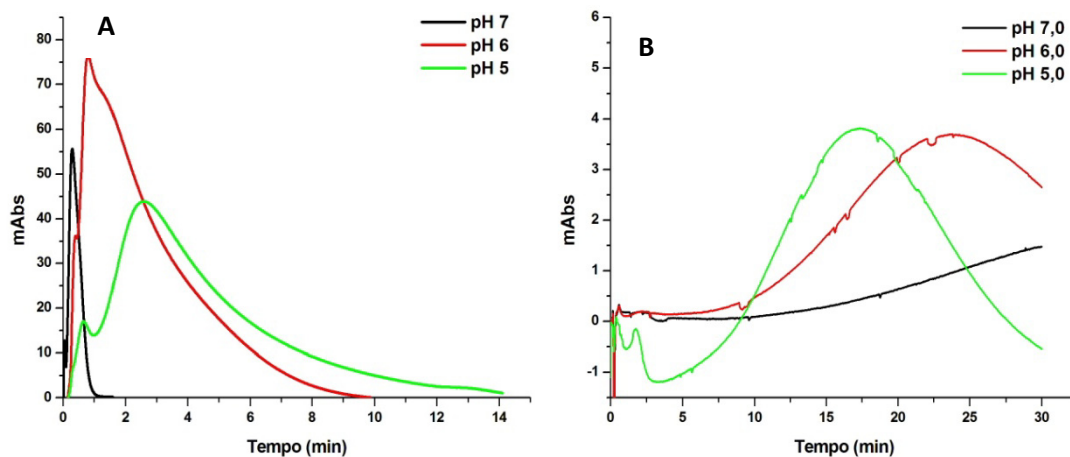


Figura 4.14: Cromatogramas de amostras de (A) Amoxicilina e (B) Ampicilina a 50 µg/mL em solução aquosa utilizando RAM MAYI C₈, com variação do pH da fase móvel. Condições cromatográficas: Fase móvel: Formiato de amônia 10 mM; vazão 1mL/min; volume de injeção 100 µL. Detecção UV 230 nm.

O tampão formiato de amônia foi utilizado na composição da fase móvel e possibilitou maior retenção para a ampicilina. Este foi escolhido também para ser utilizado durante a exclusão das macromoléculas, já que a utilização da água faz com que haja a eluição dos compostos de interesse.

Os mesmos testes foram realizados para a coluna de proteína imobilizada RAM-BSA C₈ que apresentou o mesmo caráter retentivo para a ampicilina, dessa forma, a adição de diferentes porcentagens de modificadores orgânicos na fase móvel foram testados para a diminuição da largura da banda cromatográfica referente a ampicilina em ambas as colunas. A melhor condição foi obtida com o uso do tampão formiato de amônia 10 mmol/L pH 6,0 com adição de 10% de metanol aos 8 minutos de análise. A amoxicilina também foi retida neste tipo de coluna sendo possível observar uma banda cromatográfica referente a amoxicilina com tempo de retenção de 7,6 minutos.

Após a eluição dos compostos em estudo, a coluna foi lavada com solução de limpeza e re-condicionada para a próxima análise. O cromatograma da Figura 4.16 mostra a injeção de leite e leite fortificado com amoxicilina e ampicilina nas duas colunas RAM em estudo.

Com a coluna RAM-BSA C₈ é possível analisar os dois compostos em estudo na mesma corrida cromatográfica sendo assim escolhida para estudos seguintes.

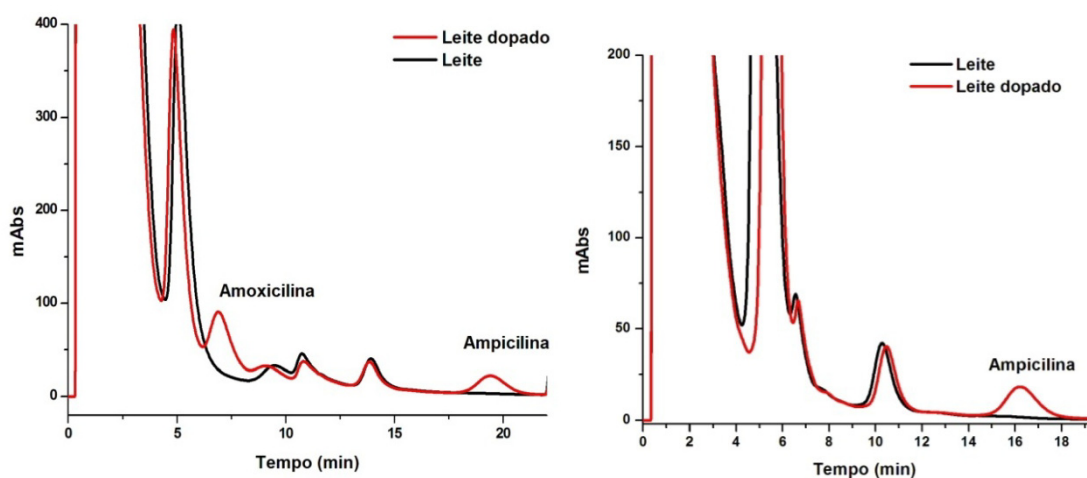


Figura 4.15: Cromatogramas referentes a amostra de leite e leite dopado com AMO e AMP (50 µg/mL) utilizando (A) RAM BSA C₈ e (B) RAM MAYI C₈. Vazão: 1mL/min; volume de injeção 100 µL. Detecção UV 230 nm.

4.3.1 - Desenvolvimento do método LC-LC/UV-vis para a quantificação dos fármacos amoxicilina e ampicilina em leite bovino.

As colunas RAM são versáteis quanto a sua utilização, podendo ser utilizadas no modo simples ou no modo multidimensional de análise. No modo simples, as amostras são diretamente injetadas no sistema cromatográfico, os interferentes e macromoléculas são eluídos e os analitos permanecem retidos com posterior extração por eluição gradiente.

No modo simples de análise a quantificação poder ser dificultada pelos componentes presentes na matriz, devido a coeluição com a substância de interesse, resultando em interferências indesejáveis.

No modo multidimensional, as colunas RAM são utilizadas na primeira dimensão, sendo capazes de remover as proteínas e pré-concentrar os analitos. Enquanto a separação cromatográfica dos compostos em análise ocorre na segunda dimensão, utilizando-se uma coluna analítica.

A transferência dos analitos pode ser classificada em *heart-cutting* ou abrangente.

No modo *heart-cutting* (LC-LC), utilizado neste trabalho, apenas os compostos de interesse são transferidos da primeira para a segunda dimensão. O resultado pode ser representado na forma de um cromatograma 1D e a principal vantagem consiste em melhor resolução dos compostos que coeluíam na primeira dimensão. No modo abrangente (LC×LC), todos os compostos presentes no cromatograma eluem através das duas colunas. A separação obtida na primeira dimensão deve ser mantida na segunda. O resultado é expresso na forma de um cromatograma 2D¹⁴⁹.

Boppana *et al.*¹⁵⁰ estudaram a injeção direta de amostras de plasma em um sistema multidimensional para a análise de granisetron e seus metabólitos 7-hidroxi utilizando como detector um espectrômetro de massas. Foram utilizadas duas colunas RAM que estão dispostas em paralelo. As injeções foram realizadas de forma alternada, com isso, houve a análise de um número maior de amostras em um dado intervalo de tempo, permitindo que o detector não permanecesse um tempo ocioso.

Outro trabalho foi feito em 2010 pelo mesmo autor seguindo a mesma vertente, porém com um sistema rápido LC-MS/MS¹⁵¹.

Os estudos aqui relatados usaram a configuração *direct flush* e a configuração do sistema cromatográfico utilizado está representado na Figura 4.17.

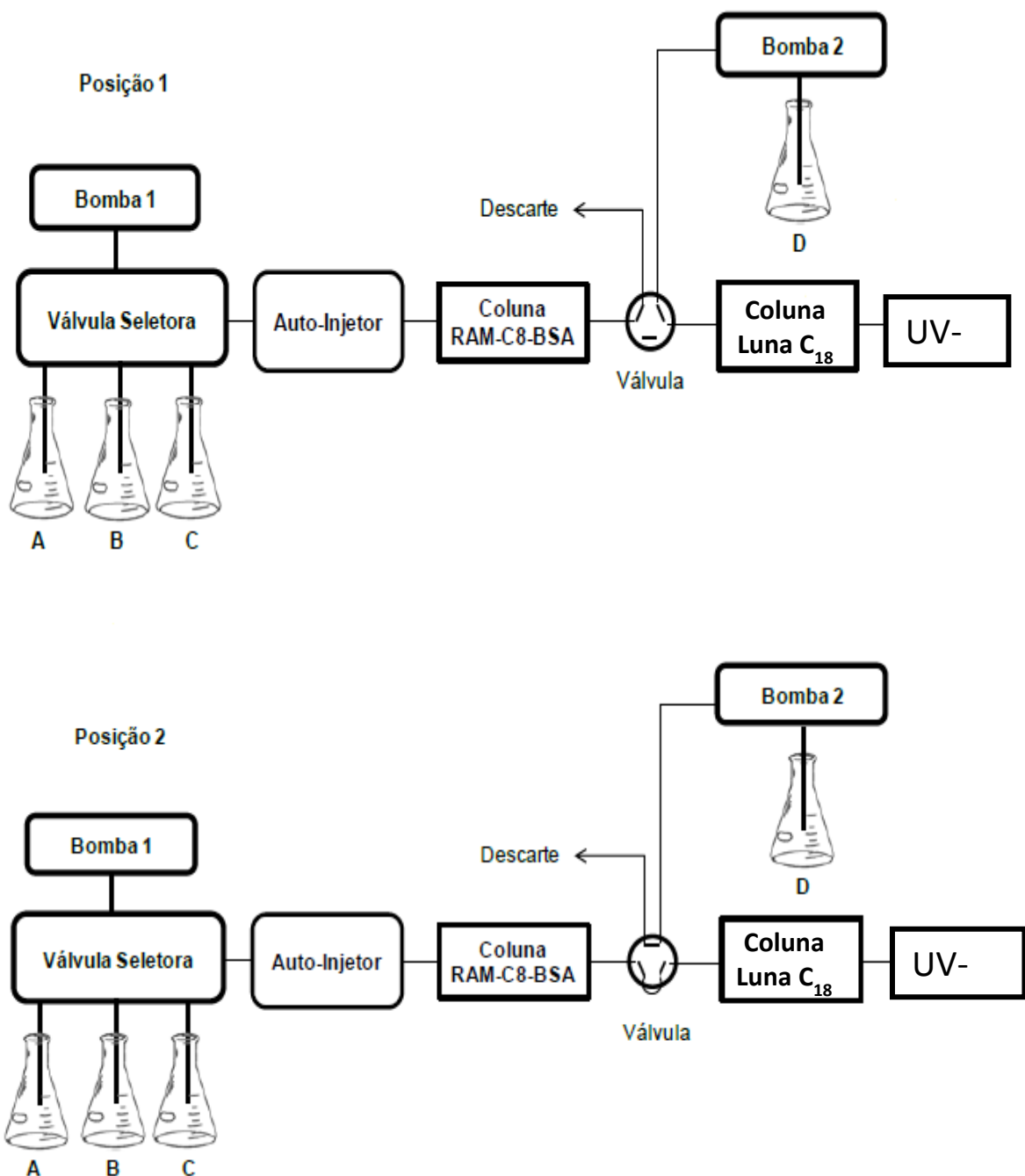


Figura 4.16: Diagrama do sistema multidimensional utilizado para o desenvolvimento do método. Posição 1: coluna RAM e coluna analítica desacopladas; Posição 2: Colunas RAM e analítica acopladas (transferência dos analitos) - Adaptado¹⁵²

A coluna RAM-BSA C₈ é utilizada na primeira dimensão e, devido a grande diferença de retenção dos compostos analisados na coluna RAM-BSA, há a possibilidade de se fazer o acoplamento com a coluna analítica em dois tempos diferentes, já que o tempo de acoplamento deve ser o menor possível para evitar a transferência de compostos interferentes e alargamento das bandas, na segunda dimensão.

Quando o composto mais retido na coluna RAM (ampicilina) é transferido para a coluna analítica, o primeiro composto transferido (amoxicilina) já havia eluído da coluna analítica, e essa ordem viabilizou a realização da transferência dos analitos com dois acoplamentos diversos.

Dessa forma, para a amoxicilina, a janela de transferência foi de 6,2 a 9,0 minutos e para a ampicilina de 18 a 21 minutos, como demonstrado pelo cromatograma referente a primeira dimensão (Figura 4.18 A). A separação analítica foi alcançada na segunda dimensão nas condições cromatográficas sumarizadas na Tabela 4.3.

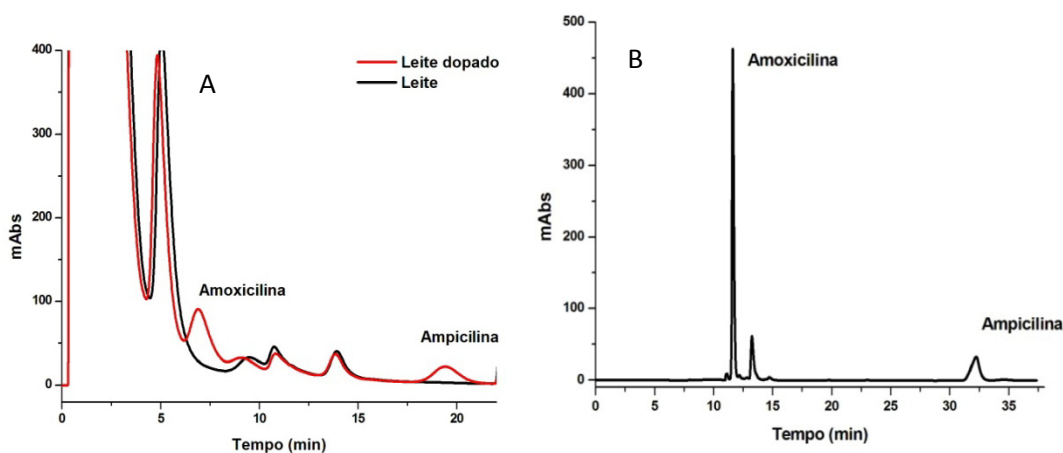


Figura 4.17: Cromatogramas referentes a amostras de leite e leite dopado com amoxicilina e ampicilina, em (A) 1D (B) 2D, na concentração de 100 µg/mL a uma vazão de 1 mL/min. Temperatura de 30⁰ C. Comprimento de onda de 230 nm. Coluna RAM-BSA C₈ (50 × 4,6 mm Luna-Phenomenex[®], 10 µm e 100 Å) e analítica C18 (150 × 4,6 mm Luna-Phenomenex[®], 10 µm e 100 Å)

Tabela 4.3: Condições utilizadas no acoplamento das colunas RAM-BSA C₈ (50 × 4,6 mm Luna-Phenomenex[®], 10 μm e 100 Å) e analítica C₁₈ (150 × 4,6 mm Luna-Phenomenex[®], 10 μm e 100 Å), para análise de amoxicilina e ampicilina em leite bovino.

Tempo (min)	Bomba	Evento	Posição da válvula
0 – 8	Linha A (Bomba 1)	Exclusão das proteínas do leite e eluição das amoxicilina pela coluna RAM	1
6,2 – 9	Linha A (Bomba 1)	Transferência da amoxicilina para a coluna analítica	2
8 – 20	Linha B (Bomba 1)	Eluição da ampicilina pela coluna RAM	1
10 – 15	Linha A (Bomba 2)	Análise da amoxicilina pela coluna analítica	1
18 – 21	Linha B (Bomba 1)	Transferência da ampicilina para a coluna analítica	2
20 – 25	Linha C (Bomba 1)	Limpeza da coluna RAM	1
25 – 40	Linha A (Bomba 1)	Condicionamento da coluna RAM	1
30 – 35	Linha A (Bomba 2)	Análise da ampicilina pela coluna analítica	1

Condições Cromatográficas: Bomba 1: (A) tampão formiato de amônia 10 mM pH 6,0; (B) tampão formiato de amônia 10 mmol/L pH 6,0 : MeOH (90:10); (C) ACN:H₂O:isopropanol (75:15:10 v/v/v) e Bomba 2: (A) tampão formiato de amônia 10 mM pH 6,0: MeOH (80:20 v/v). Volume de injeção: 200 μL; vazão:1mL/min., λ: 230 nm e T= 30 °C em ambas as colunas.

O método mostrou-se seletivo e linear para a faixa de concentração de 2,5 a 60 $\mu\text{g/mL}$, (Figura 4.19) para ambos analitos. Os coeficientes de correlação obtidos para a amoxicilina e ampicilina foram de 0,9997 e 0,9990.

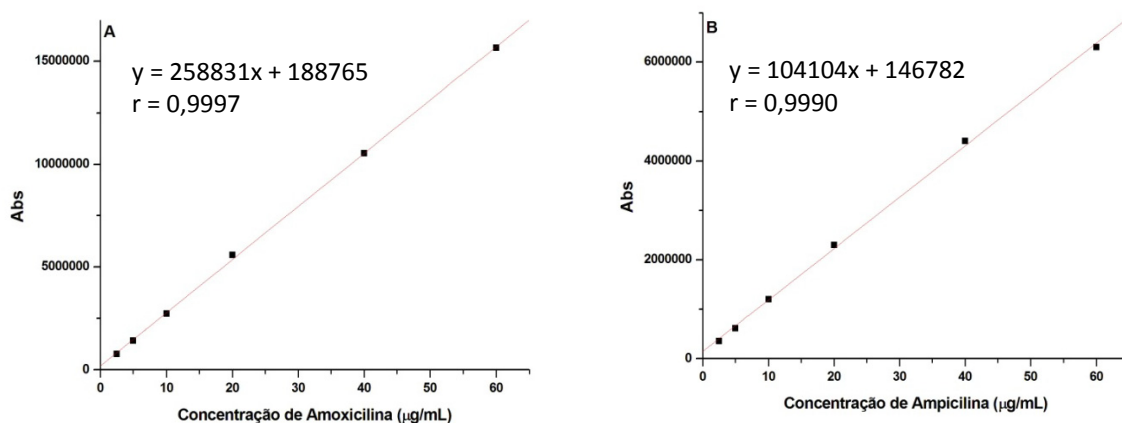


Figura 4.18: Curva analítica para a amoxicilina (A) e ampicilina (B) em leite.

4.3.2 - Avaliação da Capacidade de Retenção dos Antibióticos pelas Colunas RAM - β – lactoglobulina.

As colunas de acesso restrito podem ser classificadas e diferenciadas quanto ao material ligado/adsorvido a superfície externa do suporte sólido responsável pela exclusão de macromoléculas. Entre estes materiais estão as proteínas imobilizadas BSA e α_1 -ácido glicoproteínas (AGP).

Hermansson e Grahn¹⁵³ desenvolveram, em 1994, uma coluna com a AGP ligada covalente em sua superfície, com grupamentos C_8 e C_{18} no interior de seus poros (Biotrap, Chromatech). Os poros usados foram pequenos suficientes para que não houvesse a permeabilidade de proteínas e macromoléculas.

Hermansson e colaboradores¹⁵⁴ também utilizaram tais colunas em um sistema multidimensional, no modo *backflushing*, para a determinação de atenolol, propranolol e ibuprofeno em plasma. O uso de pareador iônico foi estudado como fator responsável pelo aumento nos valores de recuperação já que tais compostos possuem uma natureza hidrofílica e facilidade de se ligar a proteínas.

A comparação entre as colunas de extração Biotrap e LiChrospher ADS RP18 foi feita por El Mahjoub e Staub¹⁵⁵ na determinação de flunitrazepam e seus metabólitos em plasma. A diferença entre as duas colunas de extração testadas é explicada pela diferença de composição de sua superfície externa. A

coluna LiChrospher possui em sua superfície externa grupamentos dióis, enquanto a Biotrap possui a proteína AGP ligada covalente em sua superfície. A coluna Biotrap apresentou um maior tempo de vida e capacidade de suportar mais de 1500 injeções de 50 μ L de plasma se comparado com as colunas LiChrospher (800 injeções de 50 μ L de plasma), além de capacidade de utilização em uma faixa de pH mais ampla.

A avaliação e caracterização das colunas BioTrap 500 C₁₈ em condições como fase móvel, estabilidade e o máximo da quantidade de matriz injetada também foi avaliada por Yu e colaboradores¹⁵⁶.

Breindahl *et al*¹⁵⁷ utilizaram as colunas Biotrap na primeira dimensão de um sistema LC-MS/MS para a determinação de ropivacaina em plasma e Friedrich *et al*¹⁵⁸ para determinação dos metabólitos da testosterona em hepatócitos.

Dessa forma, neste trabalho, realizou-se um estudo que visa a obtenção de uma nova coluna de meio de acesso restrito de proteína: β -lactoglobulina. O modo de preparo feito foi similar ao utilizado para as colunas RAM-BSA.

Como maior constituinte presente no soro do leite bovino, a β -lactoglobulina (β LG) é uma proteína globular de aproximadamente 18,4 kDa e contém 162 resíduos de aminoácidos, seu pI está em torno de 5,2¹⁵⁹.

Uma comparação entre a quantidade relativa das principais proteínas do soro bovino no leite bovino e humano é mostrada da tabela 4.4.

Sua conformação espacial, uma espécie de cálice ou barril achatado capaz de ligar pequenas moléculas hidrofóbicas no seu interior, foi completamente elucidada por Brownlow *et al*.¹⁶⁰

Essa conformação contribui para a estabilidade da β LG em solução em uma ampla faixa de pH, porém, apresenta diferentes estados de associação. Em valores de pH acima do pI possui conformação na forma de dímeros.

Tabela 4.4: Quantidade relativa das principais proteínas do soro do leite

Proteínas do soro (g/L)	Leite Bovino	Leite Humano
β – lactoglobulina	3,2	Desprezível
α – lactoglobulina	1,2	2,8
Albumina sérica bovina (BSA)	0,4	0,6
Imunoglobulinas	0,7	1,0
Lactoferrina	0,1	0,2
Lisozima	Desprezível	0,4

A BSA, outra proteína presente no soro do leite bovino, tem conformação globular nativa, solúvel em água, tem massa molecular de 66,2 kDa, 580 resíduos de aminoácidos e pI 4,7. A albumina do soro bovino presente no leite é idêntica àquela isolada do soro sanguíneo ¹⁶¹.

Como citado anteriormente, a utilização da proteína BSA no preparo de colunas de meio de acesso restrito de proteínas imobilizadas é um método bem estabelecido, de fácil realização e que mostra resultados bastante satisfatórios como técnica de preparo de amostras *on-line*.

O sucesso do procedimento de imobilização está diretamente relacionado a presença dos resíduos de lisina na superfície das proteínas em estudo, já que estes reagem com o glutaraldeído e promovem o entrecruzamento entre as proteínas, o que confere maior estabilidade e durabilidade da coluna, evitando assim a perda de proteínas que poderia acontecer se estas estivessem apenas adsorvidas no suporte cromatográfico (Figura 4.20).

A BSA possui uma quantidade três vezes maior de resíduos de lisina em sua superfície se comparada com a β LG. A Figura 4.21 apresenta a estrutura das duas proteínas e destacado, na cor rosa, os resíduos de lisina presentes na superfície.

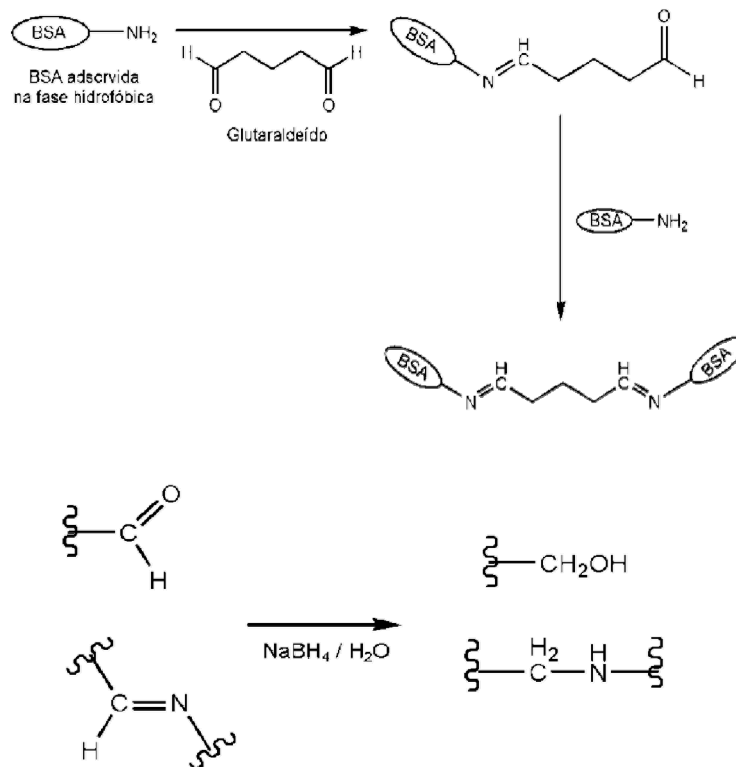


Figura 4.19: Seqüência de reações para o entrecruzamento da BSA e redução das bases de Schiff e aldeídos residuais.

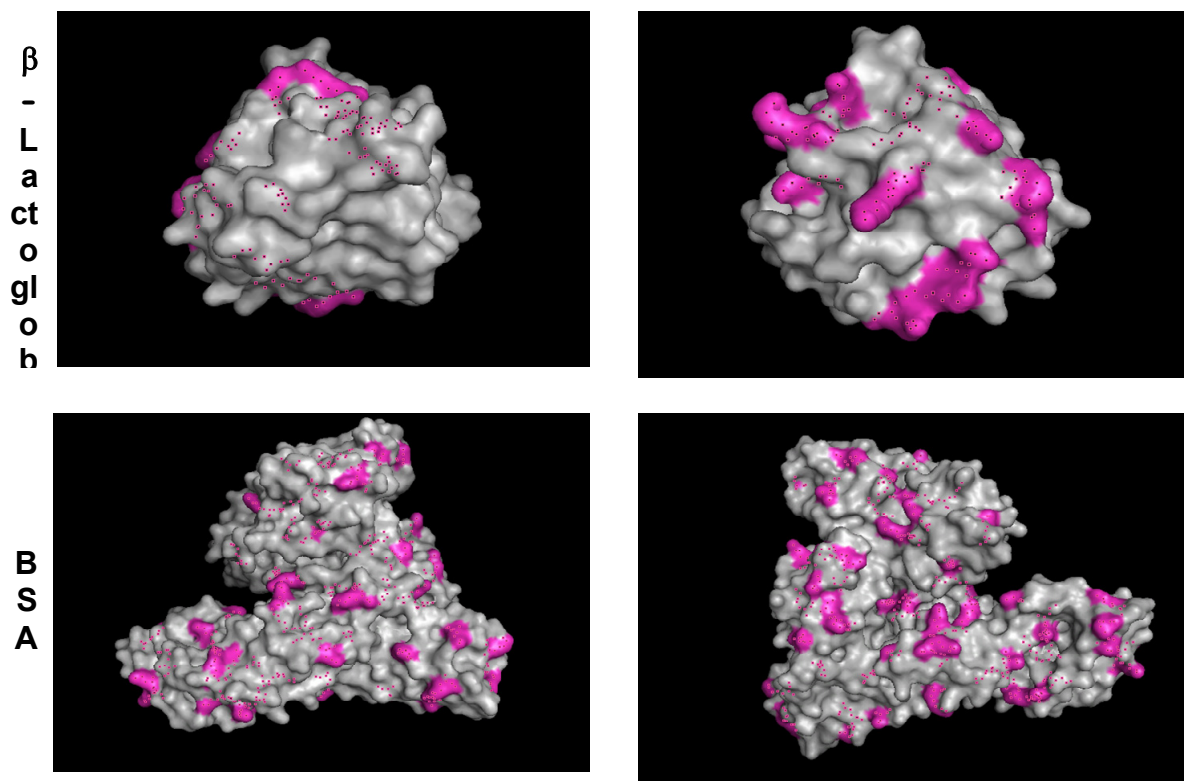


Figura 4.20: Representação estrutural da β LG e BSA, em destaque os resíduos de lisina na superfície das proteínas

As condições cromatográficas para a retenção dos antibióticos em estudo foram avaliadas nesta nova coluna. Para tal, foram testadas as condições anteriormente utilizadas em colunas RAM-BSA C₈.

As condições desenvolvidas para o método cromatográfico multidimensional, com a coluna RAM-βLG na primeira dimensão, estão descritas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Condições utilizadas no acoplamento das colunas RAM-βLG C₈ (50 × 4,6 mm Luna-Phenomenex[®], 10 μm e 100 Å) e analítica C₁₈ (150 × 4,6 mm Luna-Phenomenex[®], 10 μm e 100 Å), para análise de amoxicilina e ampicilina em leite bovino.

Tempo (min)	Bomba	Evento	Posição da válvula
0 – 2	Linha A (Bomba 1)	Exclusão das proteínas do leite	1
2 – 6	Linha B (Bomba 1)	Eluição dos fármacos amoxicilina e ampicilina	1
4 – 6	Linha B (Bomba 1)	Transferência da amoxicilina e ampicilina para a coluna analítica	2
6 – 11	Linha A (Bomba 2)	Análise da amoxicilina e ampicilina pela coluna analítica	1
6 – 11	Linha C (Bomba 1)	Limpeza da coluna RAM	1
11-16	Linha A (Bomba 1)	Condicionamento da coluna RAM	1

Condições cromatográficas: Bomba 1: (A) tampão formiato de amônia 10 mmol/L pH 6,0; (B) tampão formiato de amônia 10 mmol/L pH 6,0 : MeOH (70:30 v/v); (C) ACN:H₂O:isopropanol (75:15:10 v/v/v) e Bomba 2: (A) tampão formiato de amônia 10 mmol/L pH 6,0: MeOH (70:30 v/v). Volume de injeção: 200 μL; vazão: 1mL/min em ambas as colunas; λ: 230 nm e T= 30 °C em ambas as colunas; [AMX] = [AMP] = 20 μg/mL.

A injeção direta de leite fortificado com amoxicilina e ampicilina nas condições descritas na Tabela 7.5 forneceu o cromatograma da Figura 4.22.

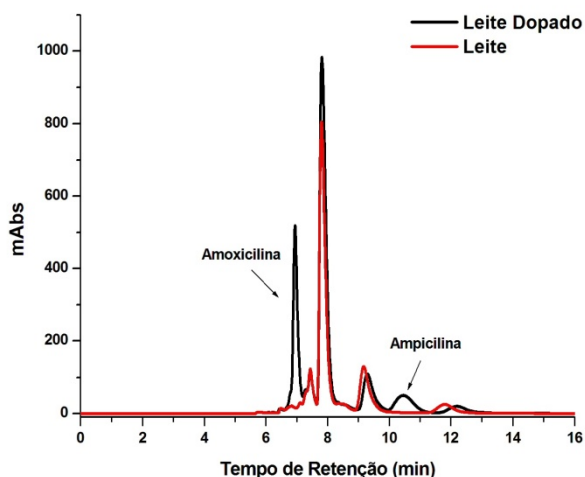


Figura 4.21: Cromatograma da análise de leite fortificado com amoxicilina e ampicilina (20 $\mu\text{g/mL}$), com acoplamento das colunas RAM- $\beta\text{LG C}_8$ (50 \times 4,6mm Luna-Phenomenex[®], 10 μm e 100 \AA) e analítica C_{18} (150 \times 4,6 mm Luna-Phenomenex[®], 10 μm e 100 \AA). Condições cromatográficas descritas na tabela 7.5.

Porém, as colunas de βLG não conseguiram manter sua eficiência na análise dos fármacos em estudo. Com o passar do tempo, a coluna perdeu sua capacidade de retenção e resolução. Na Figura 4.23 é apresentada a comparação entre cromatogramas referentes a injeção do padrão contendo amoxicilina e ampicilina em água na coluna RAM $\beta\text{LG C}_8$ em diferentes tempos: o primeiro cromatograma refere-se a uma injeção na coluna recém preparada; o segundo cromatograma refere-se a 60 dias e o terceiro cromatograma a 75 dias após o preparo.

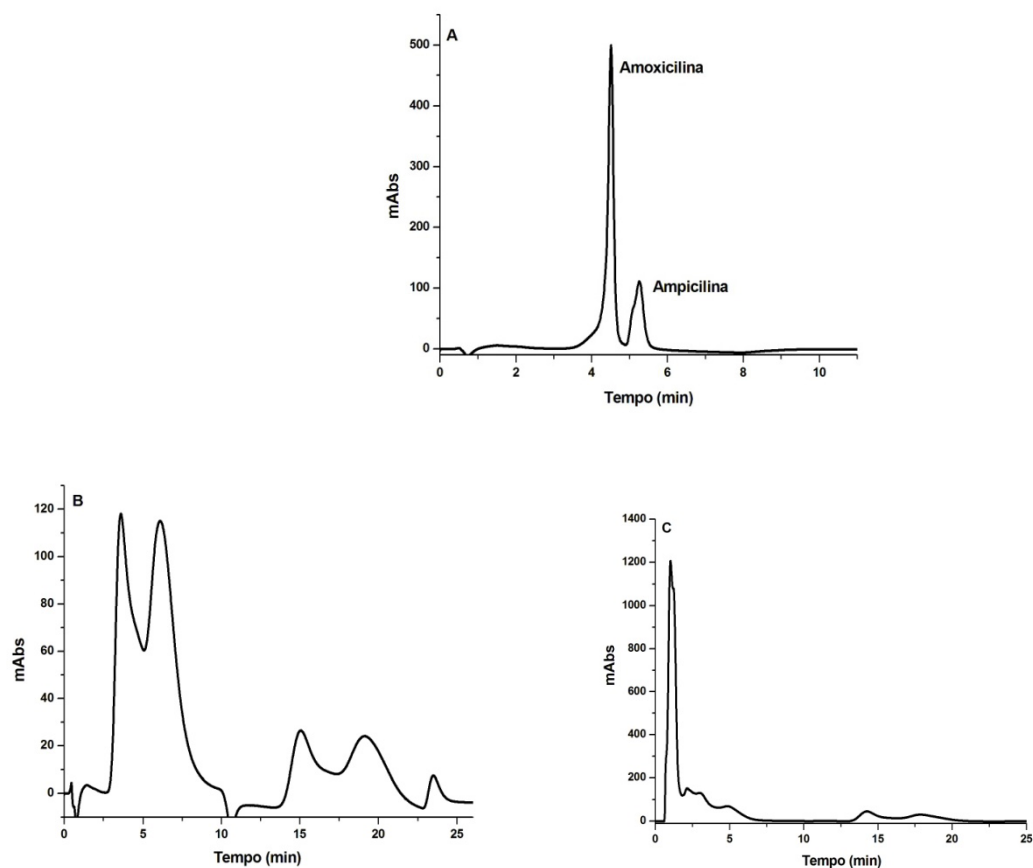


Figura 4.22: Cromatogramas referentes a injeção de padrão de amoxicilina e ampicilina em água na coluna RAM- β LG C₈ (50 × 4,6 mm Luna-Phenomenex[®], 10 μ m e 100 Å). (A) 30 dias (B) 60 dias e (C) 75 dias após o preparo da coluna.

Tal alteração no perfil cromatográfico pode ser atribuída a uma mudança na conformação da proteína imobilizada. A possível eluição da proteína foi descartada como causa da perda da resolução cromatográfica ao injetar água na coluna e monitorar o comprimento de onda referente ao máximo de absorção das proteínas, 280 nm, obtendo-se apenas a linha de base. O que sugere que a β LG foi eficientemente imobilizada no suporte cromatográfico.

Dessa forma, novas formas de imobilização devem ser estudadas de forma a garantir a estabilidade e integridade da β LG no suporte cromatográfico.

4.4 - Desenvolvimento do método LC-UHPLC-MS/MS para os fármacos amoxicilina e ampicilina.

A técnica de cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas (LC-MS) faz com que a busca por métodos com maior sensibilidade e menores limites de detecção e quantificação, maior eficiência e menor tempo de análise seja simplificada^{118,162,163}.

A evolução obtida pelo uso de colunas empacotadas com suportes cada vez menores (sub-2 μ m) e, conseqüente, um sistema capaz de suportar altas pressões, culminou no desenvolvimento da cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) que permite combinar redução no tempo de análise sem o comprometimento da resolução e eficiência de separação. Que nada mais é do que conseqüência do aumento da velocidade linear devido a baixa resistência na transferência de massas destes suportes¹⁶⁴⁻¹⁶⁶.

Vários trabalhos mostram a comparação entre os métodos desenvolvidos em ambos os sistemas e relatam como principais vantagens, a diminuição no tempo de análise e redução no consumo de solventes, além do fato de que o tempo necessário para o desenvolvimento de métodos, para equilibrar ou re-equilibrar (no caso de eluição gradiente) colunas sejam menores¹⁶⁷⁻¹⁷¹.

Dessa forma, o acoplamento entre UHPLC e um espectrômetro de massas na determinação de fármacos em matrizes complexas (matrizes biológicas^{119,122,172-175}, extratos de plantas¹⁷⁶⁻¹⁷⁸, amostras ambientais^{112,179,180} e de alimentos¹⁸¹⁻¹⁸⁴) e em níveis de concentração e tempo cada vez menores, é uma poderosa ferramenta analítica. As primeiras aplicações empregando a técnica de UHPLC foram feitas para análise de metabolomas e genomas utilizando como detector um MS com analisador de tempo de voo¹¹⁹. A Figura 4.24 mostra o aumento do número de artigos que fazem uso da técnica de UHPLC desde 2003 até 2011¹⁸⁵.

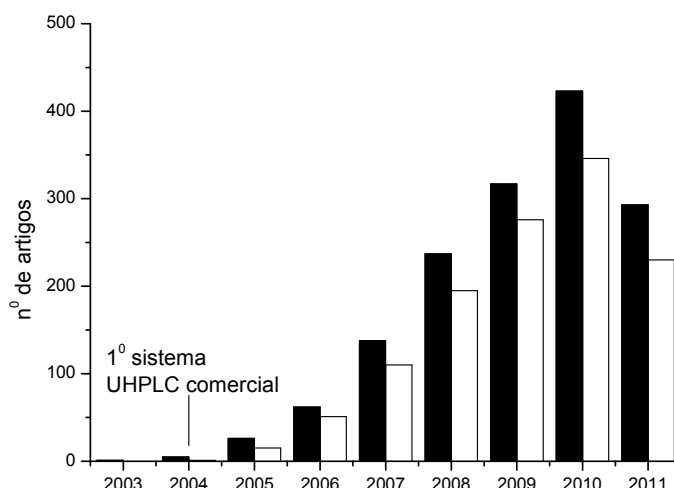


Figura 4.23: Número de artigos publicados desde o ano de 2003 até junho de 2011. Barras pretas usando como palavra chave UHPLC ou UPLC e em branco utilizando como filtro MS. Base de dados: Scopus.

Considerando a redução no tempo da corrida analítica oferecida pela técnica de UHPLC, a etapa de tratamento de amostras se torna e etapa limitante em termos de tempo total de análise. Torna-se então cada vez mais importante o desenvolvimento de métodos eficientes para a injeção direta de amostras.

Quando se utiliza um sistema cromatográfico multidimensional, a velocidade de análise na segunda dimensão é o elemento chave para se obter uma alta separação de compostos. Para atingir este objetivo, o uso de colunas UHPLC tem se mostrado uma excelente alternativa¹⁸⁶. Porém, entre os artigos em destaque, não é do nosso conhecimento o uso de injeção direta de fluidos biológicos em um sistema UHPLC usando colunas RAM na primeira dimensão.

A fase móvel utilizada na exclusão de macromoléculas, assim como a fase responsável pela retenção e transferência do analito são importantes parâmetros que devem ser otimizados em um sistema cromatográfico multidimensional. Além disso, a fase móvel usada na segunda dimensão é responsável pela separação cromatográfica e precisa ser cuidadosamente selecionada, além de ser compatível com a fase móvel utilizada na primeira dimensão.

No caso do sistema descrito neste trabalho, no qual o detector é um espectrômetro de massas, a fase móvel utilizada na segunda dimensão deve

promover a ionização dos compostos de interesse para que assim sejam detectados.

Para o desenvolvimento de um método, torna-se necessário selecionar uma fase móvel que proporcione adequada retenção dos analitos na segunda dimensão e possibilite a detecção do mesmo. A grande dificuldade desse processo está relacionada ao fato de que para um dos compostos em estudo, as melhores condições de ionização não são aplicáveis para a retenção dos mesmos¹⁰⁶.

Dessa forma, não foi possível desenvolver o método para quantificação da amoxicilina. Este composto é retido na coluna RAM-BSA C₁₈ com tampão formiato de amônia. E a infusão da amostra neste tampão mostra a formação de adutos de potássio o que impossibilitou a análise desse composto (Figura 4.25).

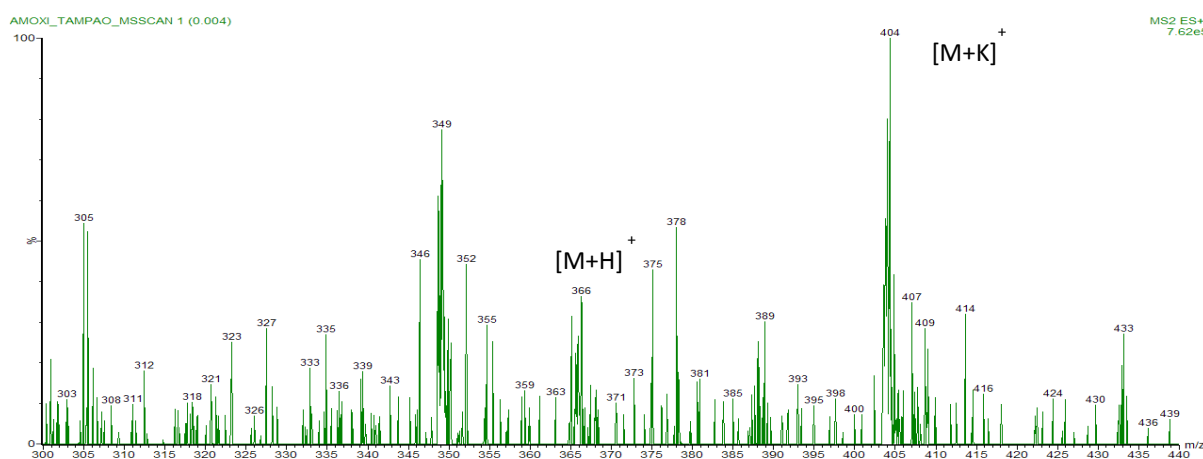


Figura 4.24: Espectro de massas obtido pela infusão da amoxicilina em tampão formiato de amônia

A ampicilina foi retida na coluna RAM-BSA utilizando ácido fórmico como fase móvel.

Foi utilizado um espectrômetro de massas Xevo TQ-MS, com fonte de ionização do tipo eletronebulização no modo positivo de análise. As condições de ionização e fragmentação da ampicilina por MS/MS foram otimizadas para se maximizar a resposta e seletividade do método, monitorando-se as transições específicas no modo MRM (monitoramento de reações múltiplas). Isto foi feito através da infusão de um padrão de ampicilina na fase móvel selecionada (solução de ácido fórmico 0,1%).

Dois fatores devem ser levados em consideração: o potencial aplicado no orifício de entrada, que pode favorecer a fragmentação da molécula protonada antes de ser selecionada no primeiro quadrupolo, e a energia fornecida à célula de colisão. Tais valores estão descritos na Tabela 4.6. A ampicilina foi analisada no modo positivo e negativo, porém a intensidade do sinal foi maior no modo positivo. Parâmetros tais como temperatura de dessolvatação 600 °C, voltagem do capilar 3,55 kV e do cone 20 V, vazão do gás de dessolvatação 900 L/Hr foram otimizados para se obter maior intensidade do sinal da molécula protonada de ampicilina. Foram monitorados o íon molecular e os íons fragmentos. A pressão e a energia do gás da célula de colisão também foram otimizados a fim de que obter uma maior intensidade fosse obtida para as transições: 350 > 106 (mais abundante, utilizada para a quantificação) 350>160 e 350>192 (para a confirmação).

Tabela 4.6: Condições de fragmentação para ampicilina.

Transição	Energia Colisão (V)	Cone (V)	Dwell(s)	Modo Ionização
350 → 106	20	20	0,1	ES+
350 → 160	12	20	0,1	ES+
350 → 192	20	20	0,1	ES+

Os espectros de massas do íon molecular bem como seus fragmentos são apresentados na Figura 4.26.

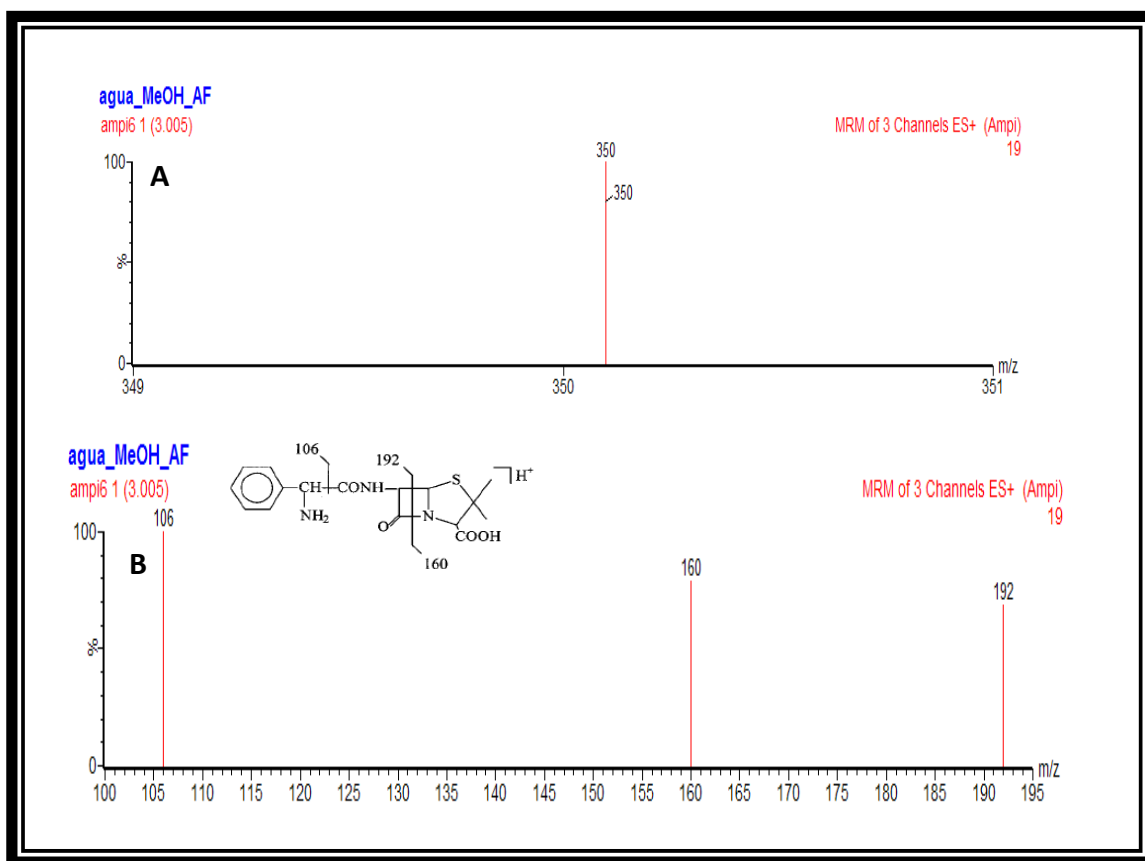


Figura 4.25: Espectro de massas, no modo SRM (*single reaction monitoring*), referente ao íon molecular (A) e íons fragmentos (B) da ampicilina

Para o método foi utilizado um sistema ACQUITY UPLC (Waters), que foi o primeiro equipamento especialmente desenvolvido para suportar altos valores de pressão (máximo de 15000 psi)¹¹⁹. O sistema usado especialmente configurado em 2D é composto por uma bomba binária e uma quaternária, com injetor automático Waters 2777C, acoplado a um Waters XEVO TQ-MS.

O sistema de injeção e acoplamento de colunas está ilustrado na Figura 4.27. A posição das válvulas é controlada pelo software Masslynx e são alternadas entre 1 e 2. Inicialmente, as amostras são injetadas na válvula Valco® (válvula 1) que se encontra na posição 1 de forma que o amostrador é preenchido com amostra. Depois de um curto intervalo de tempo, há a passagem da amostra da válvula 1 para a válvula 2 que está na posição 1. A válvula 1 passa então para a posição 2 onde há a limpeza com dois tipos de solvente. As macromoléculas presentes na amostra de leite são descartadas. A válvula 3 está na posição 1 e recebe o solvente proveniente da bomba binária. Instantes antes do acoplamento a

válvula 2 passa para a posição 2 e a válvula 3 para a posição 2. Há a passagem dos analitos da coluna RAM para a coluna analítica. Após a janela de acoplamento, a válvula 3 e 2 voltam para a posição 1, de forma que há a eluição dos compostos pela coluna analítica e a limpeza da coluna RAM.

Na primeira dimensão, foi usada uma coluna RAM BSA C₈ (30 × 2,1 mm Luna-Phenomenex®, 10 µm, 100 Å), para exclusão de macromoléculas e simultânea retenção da ampicilina enquanto na segunda dimensão foi usada uma coluna ACQUITY UPLC BEH C18 (50 × 2,1mm 1,7 µm).

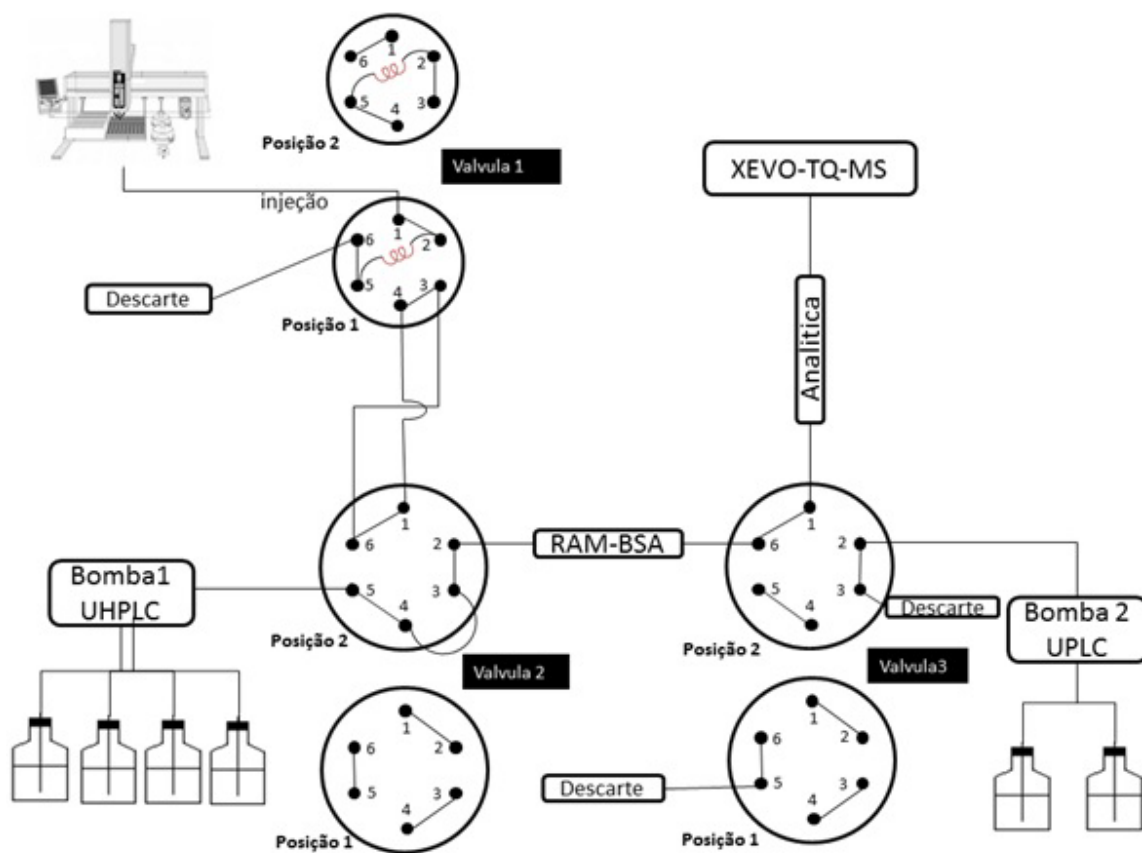


Figura 4.26: Diagrama do sistema multidimensional utilizado para o desenvolvimento e validação do método para quantificação de ampicilina em leite.

As colunas ACQUITY, utilizadas na segunda dimensão, possuem partículas híbridas produzidas pela reação de bis(trietoxissililetano) e tetraetoxissilano, que dá origem a uma partícula de sílica com pontes de etano inseridas em sua estrutura (polietoxissilano), denominada sílica híbrida de segunda geração. A combinação de material orgânico e inorgânico gera partículas menores,

com maior resistência mecânica e que são resistentes a uma extensa faixa de pH (1-12). Tal estabilidade se deve ao fato de existir pontes de carbono inseridas na superfície da sílica, estáveis a temperatura e que fornecem uma boa simetria de banda devido a quantidade reduzida de silanóis residuais¹⁸⁷.

No método inicialmente proposto foi utilizada como fase móvel uma mistura de ácido fórmico e metanol, tanto para a transferência da ampicilina como para a eluição da mesma na segunda dimensão. A descrição deste método é apresentada na Tabela 4.7.

Tabela 4.7: Condições utilizadas no acoplamento das colunas RAM-BSA C₈ (50 × 2,1 mm Luna-Phenomenex®, 10 µm e 100 Å) e analítica ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (50 × 2,1 mm 1,7 µm), para análise de ampicilina em leite bovino.

Tempo (min)	Fase Móvel	Evento	Posição da válvula		
			Válvula 1	Válvula 2	Válvula 3
0 – 2,5	QSM - H ₂ O	Exclusão das proteínas do leite pela coluna RAM	2	1	1
2,5 – 4,5	QSM - MeOH:Ác. Fórmico (0,1%)	Eluição da ampicilina pela coluna RAM	1	2	1
3,9 – 4,2	QSM - MeOH:Ác. Fórmico (0,1%) (70:30 v/v)	Transferência da ampicilina para a coluna analítica	1	2	2
4,5 – 5	BSM - MeOH:Ác. Fórmico (0,1%) (70:30 v/v)	Análise da ampicilina pela coluna analítica	1	2	1
5 – 10	QSM - ACN:H ₂ O:ISO (75:15:10 v/v)	Limpeza da coluna RAM	1	2	1
10 – 15	QSM - H ₂ O:MeOH (97:3 v/v)	Recondicionamento coluna RAM	1	2	1

Condições Cromatográficas: Volume de injeção: 10 µL, vazão: 0,4 mL/min em ambas as colunas; T = 30 °C na coluna analítica.

A Figura 4.28 representa os cromatogramas referentes as amostras de leite e leite fortificado com padrão de ampicilina na concentração de 10 ng/mL tanto no modo uni como multidimensional

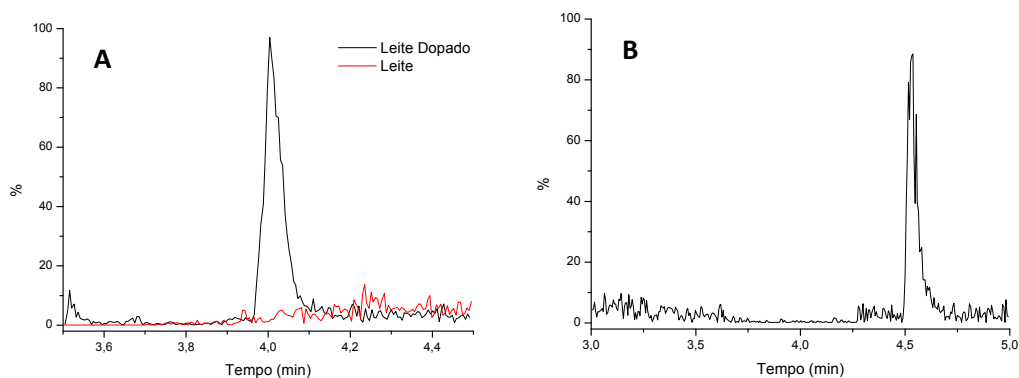


Figura 4.27: Cromatogramas referentes a injeção de amostra de leite e leite dopado com ampicilina na concentração de 10 ng/mL no modo (A) 1D e (B) 2D. Colunas: RAM-BSA C₈ (50 × 2,1 mm Luna-Phenomenex[®], 10 μm e 100 Å) e analítica ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (50 × 2,1 mm 1,7 μm). Volume de injeção: 10 μL, vazão: 0,4 mL/min em ambas as colunas; T = 30 °C na coluna analítica.

Com o intuito de minimizar o elevado valor de efeito de matriz, discutido posteriormente, foi adicionado 3% de MeOH na fase móvel da primeira dimensão para a exclusão proteínas que inicialmente foi feita com 100% de água.

Com o acoplamento entre uma coluna RAM, na primeira dimensão, com tamanho de partículas de 10 μm e uma coluna ACQUITY UPLC BEH C18, na segunda dimensão, com tamanho de partículas de 1,7 μm, esperava-se que a banda cromatográfica da ampicilina tivesse uma largura maior se comparada com a banda obtida pela injeção da ampicilina diretamente na coluna analítica da segunda dimensão, UHPLC.

A ampicilina apresentou uma largura de banda maior na coluna RAM, 0,55 min, enquanto na coluna ACQUITY e no método acoplado se manteve em 0,17 min (Figura 4.29). Isso se deve ao fato de ambas as colunas possuírem o mesmo diâmetro interno e de haver uma concentração, da parte transferida da primeira dimensão, no topo da coluna analítica, o que fez com que não houvesse um alargamento de banda, na segunda dimensão.

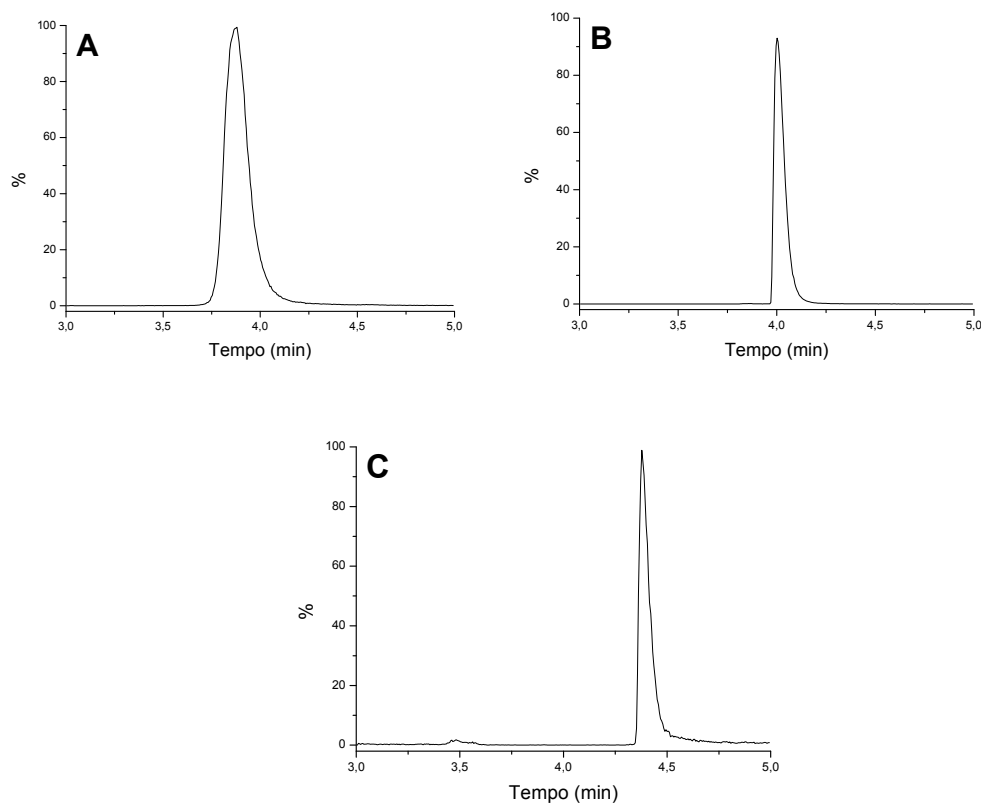


Figura 4.28: Comparação entre as larguras das bandas cromatográficas em (A) coluna RAM BSA C₈ (50 × 2,1 mm Luna-Phenomenex[®], 10 μm e 100 Å) (B) coluna ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (50 × 2,1 mm 1,7 μm) (C) método acoplado.

Porém, com estas condições cromatográficas, a vida útil da coluna RAM se mostrou muito menor do que esperado. Poucas injeções foram suficientes para causar entupimento e, conseqüentemente, aumento da pressão de volta, o que impossibilitou prosseguir com as análises.

Após a exclusão das proteínas, realizada com 100% H₂O, utilizou-se uma fase móvel com alta proporção de solvente orgânico, MeOH:Ácido fórmico (0,1%) (70:30 v/v), para a eluição da ampicilina da coluna RAM. Esta elevada porcentagem de solvente orgânico foi inicialmente atribuída como responsável pelo entupimento da coluna RAM, e sua conseqüente inutilização, devido a precipitação das proteínas imobilizadas.

Novas condições cromatográficas foram então avaliadas (Tabela 4.8): aumento em 0,5 minutos do tempo destinado a exclusão das proteínas, adição de 3% de metanol para minimizar o efeito de matriz e a inserção de um gradiente de 3 a

5 minutos, em que a proporção de metanol aumenta de forma linear de 3 a 70%. Tais alterações foram suficientes para aumentar a vida útil da coluna RAM.

Tabela 4.8: Condições utilizadas no acoplamento das colunas RAM-BSA C₈ (50 × 2,1 mm Luna-Phenomenex[®], 10 μm e 100 Å) e analítica ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (50 × 2,1 mm 1,7 μm), para análise de ampicilina em leite bovino.

Tempo (min)	Fase Móvel	Evento	Posição da válvula		
			Válvula 1	Válvula 2	Válvula 3
0 – 3	QSM - H ₂ O:MeOH (97:3 v/v)	Exclusão das proteínas do leite pela coluna RAM	2	1	1
3 – 5	QSM - MeOH:Ác. Fórmico (0,1%)	Gradiente, 3 - 70% MeOH	1	2	1
5 – 6	QSM - MeOH:Ác. Fórmico (0,1%) (70:30 v/v)	Transferência da ampicilina para a coluna analítica	1	2	2
5 – 9	BSM - MeOH:Ác. Fórmico (0,1%) (70:30 v/v)	Análise da ampicilina pela coluna analítica	1	2	1
6 – 10	QSM - H ₂ O:MeOH (97:3 v/v)	Limpeza da coluna RAM	1	2	1
10 – 14	QSM - MeOH:Ác. Fórmico (0,1%)	Recondicionamento coluna RAM	1	2	1

Condições Cromatográficas: Volume de injeção: 10 μL, vazão: 0,4 mL/min em ambas as colunas; T = 30 °C na coluna analítica.

A Figura 4.30 apresenta os cromatogramas referentes a amostra de leite e leite dopado com padrão de ampicilina na concentração de 10 ng/mL tanto no modo uni como multidimensional

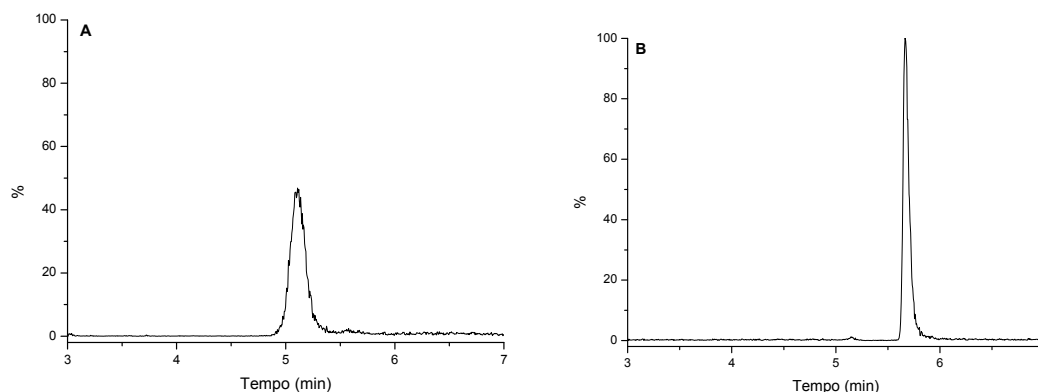


Figura 4.29: Cromatogramas referentes a injeção de amostra de leite e leite dopado com ampicilina na concentração de 10 ng/mL no modo (A) 1D e (B) 2D. Colunas: RAM-BSA C₈ (50 × 2,1 mm Luna-Phenomenex[®], 10 μm e 100 Å) e analítica ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (50 × 2,1 mm 1,7 μm). Volume de injeção: 10 μL, vazão: 0,4 mL/min em ambas as colunas; T = 30 °C na coluna analítica.

4.4.1 - Efeito de matriz

O sucesso no desenvolvimento de métodos bioanalíticos está em ajustar as condições cromatográficas de forma que a banda do analito não coelua com compostos endógenos como fosfolipídios, aminoácidos e nucleosídeos. A coeluição com tais compostos afeta a relação sinal/ruído, o que hoje é conhecido como efeito de matriz^{163,188-191}.

O advento da técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a um espectrômetro de massas, que permite a análise eficiente de pequenas moléculas em matrizes biológicas, fez com que o uso de partículas cada vez menores como suportes cromatográficos proporcionasse maior resolução e menor tempo de análise, o que sugere uma maior seletividade, e conseqüentemente menor impacto no sinal obtido^{192,193}.

Entretanto a alta seletividade proporcionada por um LC-MS não garante a eliminação efetiva de interferentes já que as técnicas de ionização a pressão atmosférica (API) podem ser substancialmente afetadas pelo aumento ou supressão do sinal obtido devido a presença de interferentes na matriz biológica.

O efeito de matriz se torna mais pronunciado com a utilização do eletrospray como fonte de ionização, isso se deve ao fato da ionização dos analitos

ocorrer na fase líquida antes de passarem para a fase gasosa. Os possíveis fatores responsáveis por tal fenômeno são dependentes das propriedades físico-químicas do composto e estão relacionados^{190,193}:

- Com a competição entre analito e interferentes pelas cargas disponíveis e pelo acesso a superfície da gota;
- Forte aumento da viscosidade da fase líquida,
- A presença de altas concentrações de componentes da matriz, o que causa um aumento na tensão superficial das gotas afetando a eficiência de formação e evaporação do spray;
- Aditivos não voláteis são responsáveis pela supressão do sinal devido a formação de partículas sólidas, ou aditivos na fase móvel ou componentes da matriz podem agir como agentes de pareamento iônico levando a formação de complexos neutros.

Avalia-se o efeito de matriz no desenvolvimento do método analítico com o objetivo de mensurar seu impacto na quantificação do fármaco em estudo e no processo de validação¹⁹⁴.

Sendo que esta avaliação pode ser feita pelo método qualitativo por infusão pós coluna e/ou quantitativo com extração *on-line* capaz de avaliar, além do efeito de matriz, a eficiência de extração⁹⁸ (Figura 4.31).

Para o método quantitativo de extração *on-line* duas soluções são preparadas e injetadas, uma contendo a substância padrão dissolvida em água e outra com a solução dissolvida na matriz, ambas na mesma concentração.

Para o cálculo do efeito de matriz é utiliza-se a seguinte fórmula:

$$EM(\%) = 100 - B/A \times 100 \quad (10)$$

A = Média das áreas das bandas da solução analito de interesse em água

B = Média das áreas da matriz dopada com o analito de interesse

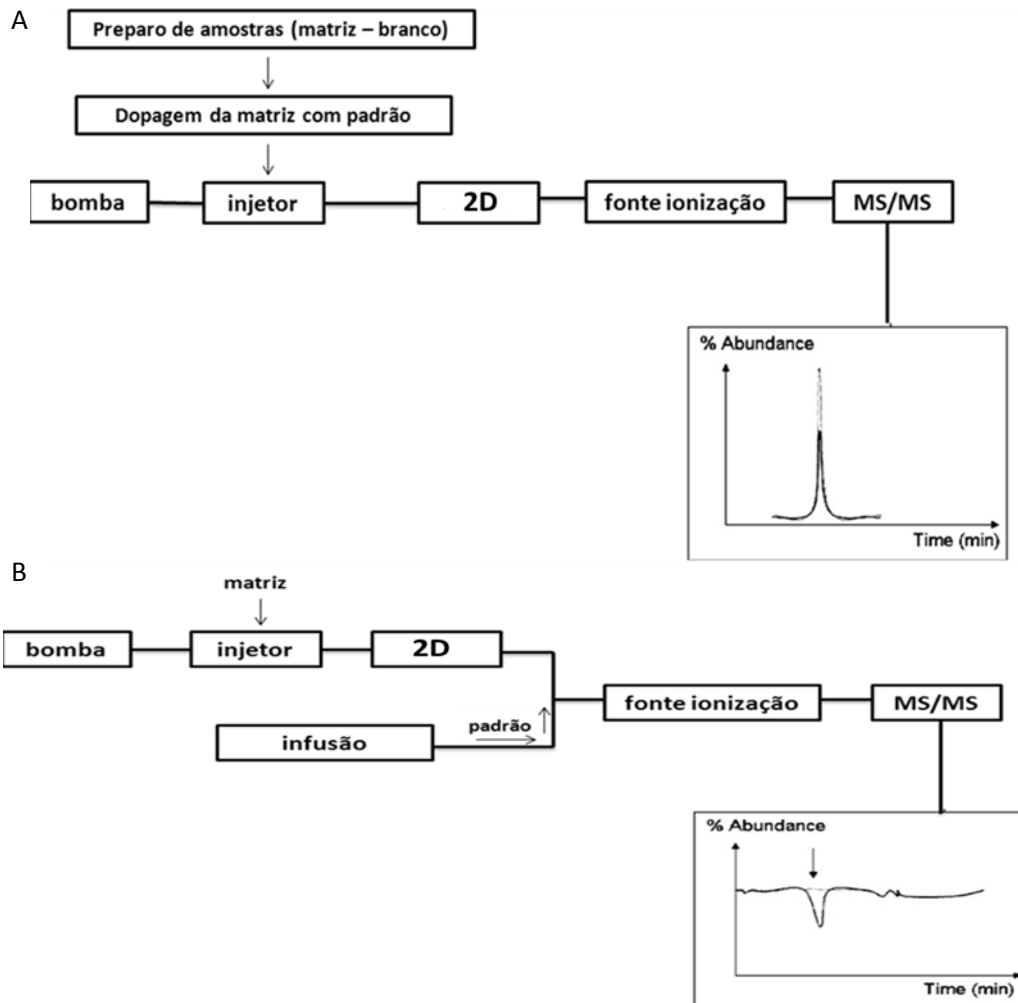


Figura 4.30: Figura adaptada da referência¹⁹⁵. Esquema dos dois métodos utilizados para avaliação do efeito de matriz (A) método de infusão pós coluna (B) método de extração *on line*.

Para a infusão pós coluna, método proposto por Bonfiglio *et al.*¹⁹⁶, uma solução com o analito é infundida constantemente no espectrômetro de massas e injeta-se a matriz de interesse no sistema cromatográfico. O efeito de matriz é então investigado com base na variação de sinal, no respectivo tempo de retenção do analito de interesse, já que é obtido um sinal constante do íon ou transição monitorada pelo tempo da corrida analítica¹⁹⁷.

Há muitas técnicas comumente empregadas para atenuar o efeito de matriz: a redução do volume de injeção ou diluição de amostra, que são úteis apenas se a sensibilidade de detecção não é afetada; pré-tratamento através de precipitação de proteínas, extração em fase sólida (SPE) ou extração líquido-líquido (LLE) ou mudanças nas condições cromatográficas.

A técnica de precipitação de proteínas, apesar de prática e rápida, mostrou-se não ser adequada, pois não é possível obter uma amostra livre de interferentes tais como lipídeos, ácidos graxos, entre outros, que são os grandes responsáveis por causar supressão no sinal quando se utiliza ESI. Já técnicas como SPE e LLE, permitem a obtenção de uma amostra com menor quantidade de interferentes^{193,198-200}.

A técnica de injeção direta em um sistema multidimensional, abordado neste trabalho, com uma coluna na RAM na primeira dimensão combina a possibilidade de se fazer o pré-tratamento com a exclusão de macromoléculas presentes na matriz biológica e de compostos endógenos durante a corrida analítica, possibilitando uma melhor resolução cromatográfica na segunda dimensão já que só os compostos de interesse são transferidos para a segunda dimensão. Um menor efeito de matriz é observado para o sinal obtido no espectrômetro de massas se comparado com sistemas unidimensionais.

Os resultados do efeito de matriz nas condições descritas na Tabela 4.7 são apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9: Valores de efeito de matriz em leite bovino desnatado para análise de ampicilina pelo modo de extração *on-line* 2D.

	[AMP] = 10 ng/mL	[AMP] = 100 ng/mL
CV(%)	6,6	9,9
Efeito de Matriz (%)	61,1	74,1

Com tais resultados, pode-se observar que o efeito de matriz, apesar de ser intenso na supressão do sinal é similar nas diferentes concentrações, 10 e 100 ng/mL. Apesar dos altos valores, o resultado é satisfatório já que em muitos

casos o efeito de matriz tem uma relação não linear com a concentração do analito em estudo, demonstrando assim a necessidade de escolher uma concentração mais próximo possível das amostras reais.

O efeito de matriz é dependente da natureza do analito e dos compostos presentes na matriz em estudo. Moléculas polares, como a ampicilina, são mais susceptíveis a supressão da ionização se comparadas com compostos menos polares^{201,202}.

Com o objetivo de minimizar o efeito de matriz, adicionou-se solvente orgânico (MeOH) na fase móvel responsável pela exclusão de macromoléculas na primeira dimensão.

Inicialmente, foi avaliado a porcentagem de metanol de 0 a 5 % na água usada como fase móvel. A porcentagem de 3% de metanol foi selecionada uma vez que houve uma redução de aproximadamente 50% no efeito de matriz, de 62% para 32%. O tipo do modificador orgânico também foi avaliado. O metanol foi o melhor modificador para minimizar o efeito de matriz. Com o uso do 2-propanol na mesma porcentagem de metanol houve uma supressão no sinal de 88%.

A adição de uma pequena quantidade de modificador orgânico ao solvente responsável pela exclusão das proteínas, neste caso água, tornou-se útil no aumento da seletividade e extração do fármaco de interesse, pois liberou o analito de sítios de ligação presentes nas proteínas do leite²⁰³.

Como pontuado anteriormente, não se deve levar em conta apenas a natureza do analito para o estudo do efeito de matriz. A otimização do preparo de amostras é de extrema importância para atenuar o mesmo e é um importante aspecto no desenvolvimento do método²⁰¹, já que é responsável pela remoção de grande parte dos compostos endógenos.

Por ser um método de injeção direta, as amostras são centrifugadas antes da injeção no sistema cromatográfico. Dessa forma aumentou-se a velocidade e o tempo pelo qual as amostras permaneciam em rotação, ou seja, de 10000 para 13000 rpm e de 10 para 30 min. As condições cromatográficas são as mesmas descritas na Tabela 4.8.

Visualmente houve uma melhora na separação das fases do leite após a centrifugação, bem como no efeito de matriz, que nesta nova condição foi de supressão no sinal de somente 23% com um CV de 12% nas replicas das análises.

As mudanças obtidas nas condições cromatográficas permitiram que houvesse mudança no tempo de retenção da ampicilina, e dessa forma o analito não coeluiu mais com os compostos responsáveis por aumentar ou suprimir a ionização da mesma^{204,205}.

O efeito de matriz para o leite desnatado também foi avaliado pelo modo de extração *on-line* e infusão pós-coluna tanto no modo unidimensional como no modo 2D. Os resultados obtidos demonstraram que em 2D o efeito matriz é reduzido em 30% quando comparado ao modo 1D²⁰⁶.

Foi avaliada também a influência da composição da matriz biológica para o efeito matriz. Para o desenvolvimento do método, a matriz utilizada foi o leite desnatado. Dessa forma, um estudo foi realizado com amostras de leite *in natura* para que fosse possível avaliar a aplicabilidade do método desenvolvido.

Tais amostras passaram pelo mesmo processo de centrifugação e fortificadas com padrão de ampicilina.

Houve diferença também com relação a matriz utilizada, o leite *in natura* proporcionou efeito de matriz maior se comparado aqueles obtidos pelo leite desnatado. Na Fig. 4.32 é mostrado o cromatograma do leite bovino *in natura* fortificado com padrão de ampicilina na concentração de 10 ng/mL.

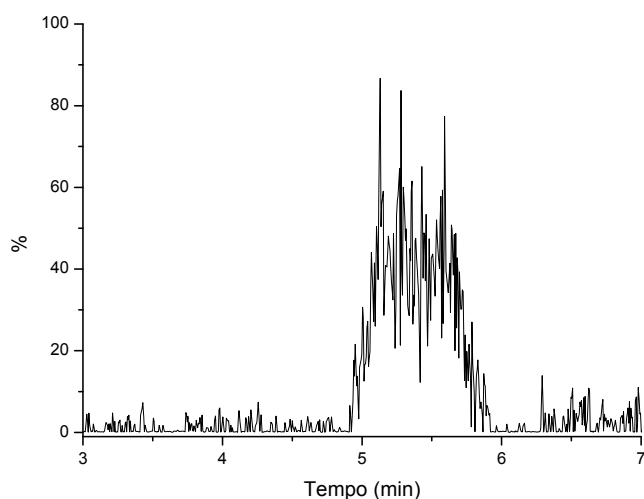


Figura 4.31: Cromatograma da amostra de ampicilina em leite bovino *in natura* após acoplamento.

O leite *in natura* possui uma maior quantidade de fosfolipídios que são responsáveis pelo aumento na supressão do sinal^{201,207}.

A Tabela 4.10 contém os valores referentes ao efeito de matriz dos diferentes tipos de leite. A Figura 4.33 apresenta a avaliação qualitativa do efeito de matriz através da infusão direta, pós-coluna, da ampicilina.

Tabela 4.10: Valores de efeito de matriz em leite bovino desnatado e in natura para análise de ampicilina pelo modo de extração *on-line* 2D

	Leite Desnatado	Leite <i>in natura</i>
CV(%) n= 5	12,3	4,2
Efeito de Matriz (%)	23,0	67,7

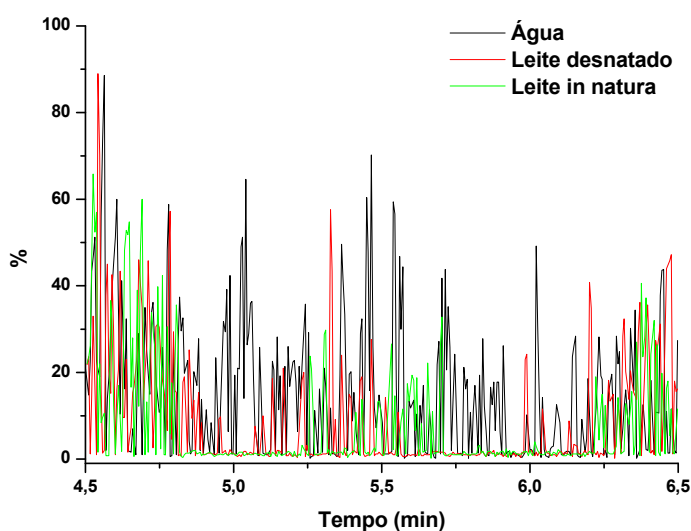


Figura 4.32: Infusão direta pós coluna de padrão de ampicilina, após a injeção de leite bovino no sistema multidimensional.

Os resultados obtidos indicaram que a otimização no preparo de amostras e/ou parâmetros cromatográficos é uma estratégia eficiente para a eliminação ou redução do efeito de matriz.

4.4.2 - Validação do método UHPLC-LC-MS/MS para a determinação de ampicilina em leite bovino.

O método analítico desenvolvido para a determinação de ampicilina em leite bovino foi validado de acordo com o guia proposto pela Anvisa²⁰⁸ para métodos bioanalíticos e pelo ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA)²⁰⁹. Foram avaliadas como figuras de mérito: linearidade, recuperação (ou eficiência de extração), precisão e exatidão, limite de quantificação e detecção e estabilidade.

A curva analítica para a ampicilina foi construída em função das áreas das bandas cromatográficas relativas as seguintes concentrações: 1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 10,0; 12,0 ng/mL.

A curva analítica obtida através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (Figura 4.34).

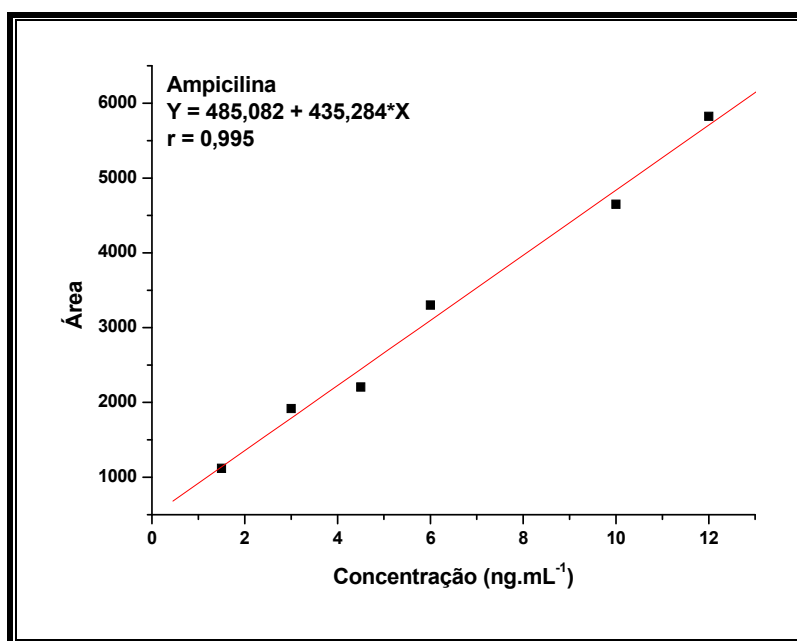


Figura 4.33: Curva analítica para a ampicilina

O coeficiente de correlação linear (r) obtido através da curva analítica foi de 0,995. A exatidão apresentou um desvio menor do que 15% do valor nominal em todas as concentrações da curva. Todos os valores obtidos estão dentro dos critérios estabelecidos para a validação do método.

Para avaliar a precisão e exatidão ²¹⁰ foram utilizadas amostras de controle de qualidade preparadas em quintuplicata, em três diferentes concentrações, (baixa, média e alta) referentes a curva analítica: 1,8; 7,2 e 9,6 µg/mL.

As precisões e exatidões, intra e interdias dos métodos foram determinadas analisando-se as quintuplicatas dos três controles de qualidade, em um mesmo dia e em dias consecutivos respectivamente. A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV) e a exatidão foi avaliada através da interpolação dos resultados na curva analítica e expressa como porcentagem de erro entre as quantidades adicionadas e as quantificadas, nas três concentrações avaliadas (Tabela 4.11).

Tabela 4.11: Precisão (CV%) e exatidão interdias e intradias do método desenvolvido

Ampicilina (ng/mL)	1 ^o dia (n=15)		2 ^o dia (n=15)		3 ^o dia (n=15)		3 dias (média)	
	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1,8	100	11,0	105	12,2	106	12,9	104	3,1
7,2	91,5	6,6	92,6	10,8	109	7,9	97,7	10,0
9,6	104	10,8	102	9,8	100	9,6	102	2,0

A precisão das replicatas apresentou coeficiente de variação entre 6,6 e 12,9%, e os valores de exatidão variaram entre 91,5 a 109%.

A eficiência de extração foi avaliada através de valores percentuais calculados através da razão entre o valor médio das áreas encontradas nas amostras preparadas em leite, com os resultados das amostras preparadas em água Milli-Q. Os resultados estão na Tabela 4.12.

Tabela 4.12: Eficiência de extração obtida para as amostras de controle de qualidade.

Concentração de ampicilina (ng/mL)	Recuperação (%)
1,8	99,8
7,2	109
9,6	98,0

Foi também avaliada a exatidão do método pela análise de amostras de concentrações desconhecidas ao analista, tanto em leite desnatado como em leite *in natura*, chamado do teste cego. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.13.

Tabela 4.13: Precisão e exatidão obtidas para a ampicilina no teste cego

Concentração de Ampicilina (ng/mL)	Leite desnatado		Leite <i>in natura</i>	
	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)
4	90,5	14,7	99,4	4,5
11	109,0	0,03	96,9	7,3

Pode-se observar que o método pode ser aplicado também para a quantificação de ampicilina em leite *in natura*, para o qual o método é destinado.

O limite de detecção de 0,1 ng/mL foi determinado pela relação sinal ruído, no qual este deve ser igual a 3. Já o limite de quantificação 1,8 ng/mL foi determinado por meio de análises da matriz fortificadas (n=3) em valores decrescentes de concentração do analito até que os valores de precisão e exatidão tivessem de 15 a 20% de variabilidade.

A avaliação do teste de estabilidade foi realizada através de amostras preparadas nas mesmas concentrações dos controles de qualidade e os fármacos foram considerados estáveis na matriz biológica ou solução se o seu coeficiente de variação (CV%) for menor ou igual a 15% com relação as concentrações iniciais.

Para avaliar a estabilidade das amostras após ciclos de congelamento e degelo, as amostras de controle de qualidade foram preparadas e analisadas imediatamente (tempo zero) e depois de congeladas a -20°C e em tempos determinados as amostras foram degeladas e analisadas (ciclos de degelo). Porém, as amostras foram estáveis apenas no primeiro ciclo (24 horas). No segundo ciclo os valores de CV% foram maiores que 15%.

CONCLUSÃO

5 – Conclusão

As colunas de meio de acesso restrito em estudo se mostraram eficientes na exclusão de proteínas do leite, tendo excluído, em média 90% das proteínas presentes no leite bovino, em dois minutos, utilizando-se apenas água como fase móvel. As colunas RAM são de fácil preparo, robustas e eficientes para serem utilizadas como colunas extratoras para os antibióticos β -lactâmicos altamente polares.

As primeiras colunas avaliadas, colunas de meio de acesso restrito de troca iônica que foram desenvolvidas com o objetivo de superar problemas relacionados à retenção de compostos altamente hidrofílicos e polares, observados com o emprego das colunas de fase reversa, não se mostraram eficientes para a retenção dos antibióticos em estudo.

Dentre as colunas de meio de acesso restrito com fase hidrofóbica, a coluna RAM BSA C₈ foi a que demonstrou melhor capacidade de retenção e assim pode ser usada para a quantificação de amoxicilina e ampicilina em uma mesma corrida analítica.

A versatilidade quanto a utilização das colunas de meio de acesso restrito, que podem ser utilizadas no modo simples ou no modo multidimensional de análise possibilitou que a coluna RAM-BSA C₈ fosse empregada na primeira dimensão e, devido a grande diferença de retenção dos compostos analisados nesta dimensão, há a possibilidade de se fazer o acoplamento com a coluna analítica em dois tempos diferentes, já que o tempo de acoplamento deve ser o menor possível para evitar a transferência de compostos interferentes. O método mostrou-se seletivo e linear para a faixa de concentração 2,5 a 60 $\mu\text{g/mL}$.

Outra proteína a ser imobilizada/adsorvida à superfície externa do suporte sólido é a β -lactoglobulina que, inicialmente possibilitou que as condições cromatográficas anteriormente utilizadas em colunas RAM-BSA C₈ fossem avaliadas para a retenção dos antibióticos em estudo, porém, a coluna RAM- β LG não conseguiu manter sua eficiência na análise dos fármacos. Com o passar do tempo, perdeu sua capacidade de retenção e resolução.

Utilizando a técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência multidimensional (LC-UHPLC) acoplada a um espectrômetro de massas (LC-

UHPLC-MS) foi possível utilizar na primeira dimensão, para a quantificação de ampicilina em leite bovino, uma coluna RAM-BSA acoplada na segunda dimensão a uma coluna ACQUITY UPLC BEH. Utilizando o modo MRM, monitoraram-se três transições específicas, 350 > 106, 350 > 160 e 350 > 192, sendo a primeira, de maior intensidade, para a quantificação e as demais para confirmação. O método é simples, com tempo de corrida de 14 minutos sem qualquer pré-tratamento de amostras. A validação foi realizada de forma a abranger todas as figuras de mérito, segundo as principais normas nacionais e internacionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 - Referências Bibliográficas

1. GOFF, D., "Dairy Chemistry and Physics". *Dairy Science and Technology Education, University of Guelph*, acesso em: setembro 2011
2. JENSEN, R.G. & ROBERT, G.J., *Introduction*, in *Handbook of Milk Composition*. 1995, Academic Press: San Diego. p. 1.
3. Produtos lácteos: algumas considerações nutricionais e econômicas, <http://www.iea.sp.gov.br>. Acesso em: agosto 2011
4. ALVIM, R., "Brasil cresce no comércio de produtos lácteos". *Sebrae agronegócios*, (6) 2007.
5. LEITE, L.D.G.-E.G.D., *Percentual da produção dos principais estados produtores de leite*. 1999.
6. IBGE, "Pesquisas trimestrais do abate de animais, do leite, do couro e da produção de ovos de galinha." *Comunicação social*, 2010.
7. Leite e sua importância econômica social, social e nutricional., <http://www.pardo-suiço.com.br/artigoleite.htm>. Acesso em: Outubro 2011
8. DELGADO, S.; GARCÍA, P.; FERNÁNDEZ, L.; JIMÉNEZ, E.; RODRÍGUEZ-BAÑOS, M.; DEL CAMPO, R. & RODRÍGUEZ, J.M., "Characterization of Staphylococcus aureus strains involved in human and bovine mastitis". *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. **62**(2): 225, 2011.
9. VIGUIER, C.; ARORA, S.; GILMARTIN, N.; WELBECK, K. & O'KENNEDY, R., "Mastitis detection: current trends and future perspectives". *Trends in Biotechnology*. **27**(8): 486, 2009.
10. BANSAL, B.; BAJWA, N.; RANDHAWA, S.; RANJAN, R. & DHALIWAL, P., "Elimination of erythromycin in milk after intramammary administration in cows with specific mastitis: relation to dose, milking frequency and udder health". *Tropical Animal Health and Production*: 1, 2011.
11. HOGEVEEN, H.; HUIJPS, K. & LAM, T.J., "Economic aspects of mastitis: New developments". *New Zealand Veterinary Journal*. **59**(1): 16, 2011.
12. HUIJPS, K.; LAM, T.J.G.M. & HOGEVEEN, H., "Costs of mastitis: Facts and perception". *Journal of Dairy Research*. **75**(1): 113, 2008.
13. HORTET, P., SEEGERS, H., "Loss in milk yield and related compositions changes resulting from clinical mastitis in dairy cows". *Preventive Veterinary Medicine*. **37**: 1, 1998.
14. LEITNER, G.; MERIN, U. & SILANIKOVE, N., "Effects of glandular bacterial infection and stage of lactation on milk clotting parameters: Comparison among cows, goats and sheep". *International Dairy Journal*. **21**(4): 279, 2011.
15. *Current concepts of bovine mastitis*. in *National Mastitis Council*. 1996. Madson.
16. SAMANIDOU, V.F.; EVAGGELOPOULOU, E.N. & PAPADOYANNIS, I.N., "Chromatographic analysis of penicillins in pharmaceutical formulations and biological fluids". *Journal of Separation Science*. **29**(12): 1879, 2006.
17. DENOBILE, M.N., E. S., "Validação de método para a determinação de resíduos de antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência". *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*. **40**(2): 209, 2004.
18. STOLKER, A.A.M. & BRINKMAN, U.A.T., "Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - a review". *Journal of Chromatography A*. **1067**(1-2): 15, 2005.

19. NASCIMENTO, G.G.F.M., V.; CAMPOS, M. S. P., "Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP". *Rev. Nutr.* **14**(2): 119, 2001.
20. NERO, L.A.M., M.R.;BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; FRANCO, B.D.G.M., "Resíduos de antibióticos de leite cru de quatro regiões leiteiras do Brasil". *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **27**(2): 391, 2007.
21. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P.E.A., "Instrução normativa nº 42 de 20 de dezembro de 1999, Anexo IV". 1999.
22. COMMUNITIES, O.J.O.E., "Council Regulation (EEC) nº 2377/90 of June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medical products in foodstuffs of animal origin (OJ nº L 224, 18.8.1990), Annex 1". 29, 2002.
23. ADMINISTRATION, F.A.D., "Evaluating the safety of antimicrobial new animal drug with regard to their microbiological effects on bacteria of human health concern." *U.S. Department of Health and Human Services, Center for Veterinary Medicine*: 36, 2003.
24. Antibióticos,
http://www.eq.ufrrj.br/biose/nukleo/aulas/Microbiol/eqb353_aula_18.pdf.
Acesso: Agosto 2011.
25. TUC DINH, Q.; ALLIOT, F.; MOREAU-GUIGON, E.; EURIN, J.; CHEVREUIL, M. & LABADIE, P., "Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC-MS/MS". *Talanta* **85**(3), 2011.
26. OLIVEIRA, J.H.H.L.d.; GRANATO, A.C.; HIRATA, D.B.; HOKKA, C.O.; BARBOZA, M. & TRSIC, M., "Ácido clavulânico e cefamicina c: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação". *Química Nova*. **32**: 2142, 2009.
27. GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.D.S. & PUPO, M.N.T., "Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes". *Química Nova*. **33**: 667, 2010.
28. CIONE, A.P.P.; LIBERALE, M.R.J. & SILVA, P.M.D., "Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação de associação de ampicilinas em pó liofilizado para injeção". *Química Nova*. **33**: 203, 2010.
29. DE BRABANDER, H.F.; NOPPE, H.; VERHEYDEN, K.; BUSSCHE, J.V.; WILLE, K.; OKERMAN, L.; VANHAECKE, L.; REYBROECK, W.; OOGHE, S. & CROUBELS, S., "Residue analysis: Future trends from a historical perspective". *Journal of Chromatography A*. **1216**(46): 7964, 2009.
30. ORTELLI, D.; COGNARD, E.; JAN, P. & EDDER, P., "Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry". *Journal of Chromatography B*. **877**(23): 2363, 2009.
31. STOLKER, A.A.M.; PETERS, R.J.B.; ZUIDERENT, R.; DIBUSSOLO, J.M. & MARTINS, C.P.B., "Fully automated screening of veterinary drugs in milk by turbulent flow chromatography and tandem mass spectrometry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **397**(7): 2841, 2011.
32. BARRON, D.; MARTINEZ-HUELAMO, M.; JIMENEZ-GAMEZ, E.; HERMO, M.P. & BARBOSA, J., "Determination of penicillins in milk using LC-UV, LC-MS and LC-MS/MS". *Journal of Separation Science*. **32**(14): 2385, 2009.
33. BILANDZIC, N.; KOLANOVIC, B.S.; VARENINA, I.; SCORTICHINI, G.; ANNUNZIATA, L.; BRSTILO, M. & RUDAN, N., "Veterinary drug residues determination in raw milk in Croatia". *Food Control*. **22**(12): 1941, 2011.

34. BAILÓN-PÉREZ, M.I.; GARCÍA-CAMPAÑA, A.M.; DEL OLMO-IRUELA, M.; GÁMIZ-GRACIA, L. & CRUCES-BLANCO, C., "Trace determination of 10 [beta]-lactam antibiotics in environmental and food samples by capillary liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*. **1216**(47): 8355, 2009.
35. FERNANDEZ-TORRES, R.; CONSENTINO, M.O.; LOPEZ, M.A.B. & MOCHON, M.C., "Simultaneous determination of 11 antibiotics and their main metabolites from four different groups by reversed-phase high-performance liquid chromatography-diode array-fluorescence (HPLC-DAD-FLD) in human urine samples". *Talanta*. **81**(3): 871, 2010.
36. KANTIANI, L.; FARRE, M.; FREIXIEDAS, J.M.G.I. & BARCELO, D., "Development and validation of a pressurised liquid extraction liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry method for beta-lactams and sulfonamides in animal feed". *Journal of Chromatography A*. **1217**(26): 4247, 2010.
37. KATAOKA, H., "New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **22**(4): 232, 2003.
38. KOLE, P.L.; VENKATESH, G.; KOTECHA, J. & SHESHALA, R., "Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods". *Biomedical Chromatography*. **25**(1-2): 199, 2011.
39. CHOI, J.-H.; MAMUN, M.I.R.; ABD EL-ATY, A.M.; PARK, J.-H.; SHIN, E.-H.; YEON PARK, J.; CHO, S.-K.; CHUL SHIN, S.; BONG LEE, K. & SHIM, J.-H., "Development of a single-step precipitation cleanup method for the determination of enrofloxacin, ciprofloxacin, and danofloxacin in porcine plasma". *Food Chemistry*. **127**(4): 1878, 2011.
40. WU, L.; WU, J.; ZHOU, K.; CHENG, F. & CHEN, Y., "Determination of isotretinoin in human plasma by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **56**(2): 324, 2011.
41. GIANNETTI, L.; GIORGI, A.; NECCI, F.; FERRETTI, G.; BUIARELLI, F. & NERI, B., "Validation study on avermectine residues in foodstuffs". *Analytica Chimica Acta*. **700**(1-2): 11, 2011.
42. ARTHUR, C.L. & PAWLISZYN, J., "Solid-Phase Microextraction with Thermal-Desorption Using Fused-Silica Optical Fibers". *Analytical Chemistry*. **62**(19): 2145, 1990.
43. DIETZ, C.; SANZ, J. & CÁMARA, C., "Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques". *Journal of Chromatography A*. **1103**(2): 183, 2006.
44. KATAOKA, H. & SAITO, K., "Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **54**(5): 926, 2011.
45. MAHUGO-SANTANA, C.; SOSA-FERRERA, Z.; TORRES-PADRÓN, M.E. & SANTANA-RODRÍGUEZ, J.J., "Application of new approaches to liquid-phase microextraction for the determination of emerging pollutants". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **30**(5): 731, 2011.
46. DE OLIVEIRA, A.R.M.M., I. R. S; DE SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. , "Microextração em fase líquida (LPME): Fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos." *Química Nova*. **31**(3): 637, 2008.
47. LIU, H. & DASGUPTA, P.K., "Analytical Chemistry in a Drop. Solvent Extraction in a Microdrop". *Analytical Chemistry*. **68**(11): 1817, 1996.

48. UGLAND, H.G.; KROGH, M. & REUBSAET, L., "Three-phase liquid-phase microextraction of weakly basic drugs from whole blood". *Journal of Chromatography B*. **798**(1): 127, 2003.
49. SARAFRAZ-YAZDI, A. & AMIRI, A., "Liquid-phase microextraction". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **29**(1): 1, 2010.
50. ASSADI, Y.; REZAEI, M.; HOSSEINIA, M.R.M.; AGHAEI, E.; AHMADI, F. & BERIJANI, S., "Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction". *Journal of Chromatography A*. **1116**(1-2): 1, 2006.
51. NUHU, A.A.; BASHEER, C. & SAAD, B., "Liquid-phase and dispersive liquid-liquid microextraction techniques with derivatization: Recent applications in bioanalysis". *Journal of Chromatography B*. **879**(17-18): 1180, 2011.
52. YAN, H.; WANG, H.; QIN, X.; LIU, B. & DU, J., "Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for determination of fluoroquinolones in pharmaceutical wastewater". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **54**(1): 53, 2011.
53. LIU, B.; YAN, H.; QIAO, F. & GENG, Y., "Determination of clenbuterol in porcine tissues using solid-phase extraction combined with ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC-UV detection". *Journal of Chromatography B*. **879**(1): 90, 2011.
54. REZAEI, M.; YAMINI, Y. & FARAJI, M., "Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method". *Journal of Chromatography A*. **1217**(16): 2342, 2009.
55. MASHAYEKHI, H.; ABROOMAND-AZAR, P.; SABER-TEHRANI, M. & HUSAIN, S., "Rapid Determination of Carbamazepine in Human Urine, Plasma Samples and Water Using DLLME followed by RP-LC". *Chromatographia*. **71**(5): 517, 2009.
56. YAN, H.; LIU, B.; DU, J.; YANG, G. & ROW, K.H., "Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of six pyrethroids in river water". *Journal of Chromatography A*. **1217**(32): 5152, 2010.
57. RAMOS PAYÁN, M.; LÓPEZ, M.Á.B.; FERNÁNDEZ-TORRES, R.; NAVARRO, M.V. & MOCHÓN, M.C., "Hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME) for a highly sensitive HPLC determination of sulfonamides and their main metabolites". *Journal of Chromatography B*. **879**(2): 197, 2011.
58. YUDTHAVORASIT, S.; CHIAOCHAN, C. & LEEPIPATPIBOON, N., "Simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in water using carrier-mediated hollow-fiber liquid-phase microextraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry". *Microchimica Acta*. **172**(1): 39, 2011.
59. YANG, Y.; CHEN, J. & SHI, Y.-P., "Determination of aristolochic acid in urine using hollow fiber liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography". *Biomedical Chromatography*. **24**(12): 1350, 2010.
60. EBRAHIMZADEH, H.; ASGHARINEZHAD, A.A.; ABEDI, H. & KAMAREI, F., "Optimization of carrier-mediated three-phase hollow fiber microextraction combined with HPLC-UV for determination of propylthiouracil in biological samples". *Talanta*. **85**(2): 1043, 2011.
61. PAYÁN, M.R.; LÓPEZ, M.Á.B.; FERNÁNDEZ-TORRES, R.; BERNAL, J.L.P. & MOCHÓN, M.C., "HPLC determination of ibuprofen, diclofenac and salicylic acid using hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME)". *Analytica Chimica Acta*. **653**(2): 184, 2009.

62. YANG, Y.; CHEN, J. & SHI, Y.-P., "Determination of aconitine, hypaconitine and mesaconitine in urine using hollow fiber liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography B*. **878**(28): 2811, 2010.
63. TAHMASEBI, E.; YAMINI, Y. & SALEH, A., "Extraction of trace amounts of pioglitazone as an anti-diabetic drug with hollow fiber liquid phase microextraction and determination by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection in biological fluids". *Journal of Chromatography B*. **877**(20-21): 1923, 2009.
64. RAMOS PAYÁN, M.; BELLO LÓPEZ, M.Á.; FERNÁNDEZ-TORRES, R.; GONZÁLEZ, J.A.O. & CALLEJÓN MOCHÓN, M., "Hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME) as a new approach for the HPLC determination of fluoroquinolones in biological and environmental matrices". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **55**(2): 332, 2011.
65. SOBHI, H.R.; YAMINI, Y. & ABADI, R.H.H.B., "Extraction and determination of trace amounts of chlorpromazine in biological fluids using hollow fiber liquid phase microextraction followed by high-performance liquid chromatography". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **45**(5): 769, 2007.
66. DE FREITAS, D.F.; PORTO, C.E.D.; VIEIRA, E.P. & DE SIQUEIRA, M.E.P.B., "Three-phase, liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detection for the simultaneous determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **51**(1): 170, 2010.
67. WU, H.-F.; KAILASA, S.K. & LIN, C.-H., "Single drop microextraction coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for rapid and direct analysis of hydrophobic peptides from biological samples in high salt solution". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **25**(2): 307, 2011.
68. JEANNOT, M.A.; PRZYJAZNY, A. & KOKOSA, J.M., "Single drop microextraction--Development, applications and future trends". *Journal of Chromatography A*. **1217**(16): 2326, 2010.
69. LÓPEZ-DARIAS, J.; GERMÁN-HERNÁNDEZ, M.; PINO, V. & AFONSO, A.M., "Dispersive liquid-liquid microextraction versus single-drop microextraction for the determination of several endocrine-disrupting phenols from seawaters". *Talanta*. **80**(5): 1611, 2010.
70. MULLETT, W.M., "Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis". *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **70**(2): 263, 2007.
71. DIONÍSIO A.G.G, B.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**(3): 19, 2010.
72. BÉNET, T. & AUSTIN, S., "On-line cleanup for 2-aminobenzamide-labeled oligosaccharides". *Analytical Biochemistry*. **414**(1): 166, 2011.
73. DODGEN, T.M.; CROMARTY, A.D. & PEPPER, M.S., "Quantitative plasma analysis using automated online solid-phase extraction with column switching LC-MS/MS for characterising cytochrome P450 2D6 and 2C19 metabolism". *Journal of Separation Science*. **34**(10): 1102, 2011.
74. MARTIN, J.; DESLANDES, G.; DAILLY, E.; RENAUD, C.; RELIQUET, V.; RAFFI, F. & JOLLIET, P., "A liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for quantification of nevirapine, indinavir, atazanavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir, lopinavir, efavirenz, tipranavir, darunavir and maraviroc in the plasma

- of patients infected with HIV". *Journal of Chromatography B*. **877**(27): 3072, 2009.
75. XU, R.N.; FAN, L.; RIESER, M.J. & EL-SHOUBAGY, T.A., "Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **44**(2): 342, 2007.
 76. RODRÍGUEZ-GONZALO, E.; GARCÍA-GÓMEZ, D. & CARABIAS-MARTÍNEZ, R., "Development and validation of a method for the detection and confirmation of biomarkers of exposure in human urine by means of restricted access material-liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. **1217**(1): 40, 2009.
 77. WEI, F. & FENG, Y.-Q., "Methods of sample preparation for determination of veterinary residues in food matrices by porous monolith microextraction-based techniques". *Analytical Methods*. **3**(6): 1246, 2011.
 78. XU, R.N.; VACA, P.; RIESER, M.J. & EL-SHOUBAGY, T.A., "Highly sensitive LC-MS-MS analysis of a pharmaceutical compound in human plasma using monolithic phase-based on-line extraction". *Journal of Chromatographic Science*. **47**(6): 473, 2009.
 79. NAMERA, A.; NAKAMOTO, A.; SAITO, T. & MIYAZAKI, S., "Monolith as a new sample preparation material: Recent devices and applications". *Journal of Separation Science*. **34**(8): 901, 2011.
 80. PENG, X.-T.; SHI, Z.-G. & FENG, Y.-Q., "Rapid and high-throughput determination of cationic surfactants in environmental water samples by automated on-line polymer monolith microextraction coupled to high performance liquid chromatography-mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. **1218**(23): 3588, 2011.
 81. DESILETS, C.P.; ROUNDS, M.A. & REGNIER, F.E., "Semipermeable-Surface Reversed-Phase Media for High-Performance Liquid-Chromatography". *Journal of Chromatography*. **544**(1-2): 25, 1991.
 82. CASSIANO, N.; LIMA, V.; OLIVEIRA, R.; DE PIETRO, A. & CASS, Q., "Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **384**(7): 1462, 2006.
 83. HAGESTAM, I.H. & PINKERTON, T.C., "Internal Surface Reversed-Phase Silica Supports for Liquid-Chromatography". *Analytical Chemistry*. **57**(8): 1757, 1985.
 84. YOSHIDA, H.; MORITA, I.; TAMAI, G.; MASUJIMA, T.; TSURU, T.; TAKAI, N. & IMAI, H., "Some Characteristics of a Protein-Coated Ods Column and Its Use for the Determination of Drugs by the Direct Injection-Analysis of Plasma Samples". *Chromatographia*. **19**: 466, 1984.
 85. MENEZES, M.L. & FELIX, G., "Analysis of organochlorine pesticides in plain milk using direct injection on an ISRP column, with column switching". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **19**(19): 3221, 1996.
 86. MENEZES, M.L. & FELIX, G., "On line extraction and separation of bendiocarb, methomyl, methylparathion, and pentachlorophenol pesticides from raw milk". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **21**(18): 2863, 1998.
 87. MENEZES, M.L.; FELIX, G. & DEMARCHI, A.C.C.O., "On-line extraction and determination of carbofuran in raw milk by direct HPLC injection on an ISRP column". *Chromatographia*. **47**(1-2): 81, 1998.
 88. CASS, Q.B.; LIMA, V.V.; OLIVEIRA, R.V.; CASSIANO, N.M.; DEGANI, A.L.G. & PEDRAZZOLI, J., "Enantiomeric determination of the plasma levels of

- omeprazole by direct plasma injection using high-performance liquid chromatography with achiral-chiral column-switching". *Journal of Chromatography B*. **798**(2): 275, 2003.
89. BELAZ, K.R.A.; CASS, Q.B. & OLIVEIRA, R.V., "Determination of albendazole metabolites by direct injection of bovine plasma and multidimensional achiral-chiral high performance liquid chromatography". *Talanta*. **76**(1): 146, 2008.
 90. CASS, Q.B.; GOMES, R.F.; CALAFATTI, S.A. & PEDRAZOLLI, J., "Determination of amoxicillin in human plasma by direct injection and coupled-column high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*. **987**(1-2): 235, 2003.
 91. GOMES, R.F.; CASSIANO, N.M.; PEDRAZZOLI, J. & CASS, Q.B., "Two-Dimensional Chromatography Method Applied to the Enantiomeric Determination of Lansoprazole in Human Plasma by Direct Sample Injection". *Chirality*. **22**(1): 35, 2010.
 92. CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G.; CASSIANO, N.M. & PEDRAZOLLI, J., "Enantiomeric determination of pantoprazole in human plasma by multidimensional high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **766**(1): 153, 2002.
 93. OLIVEIRA, R.V.; DE PIETRO, A.C. & CASS, Q.B., "Quantification of cephalexin as residue levels in bovine milk by high-performance liquid chromatography with on-line sample cleanup". *Talanta*. **71**(3): 1233, 2007.
 94. OLIVEIRA, R.V. & CASS, Q.B., "Evaluation of liquid chromatographic behavior of cephalosporin antibiotics using restricted access medium columns for on-line sample cleanup of bovine milk". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**(4): 1180, 2006.
 95. PEREIRA, A.V. & CASS, Q.B., "High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk using an on-line clean-up column". *Journal of Chromatography B*. **826**(1-2): 139, 2005.
 96. ANDRADE, L.S.; DE MORAES, M.C.; ROCHA-FILHO, R.C.; FATIBELLO-FILHO, O. & CASS, Q.B., "A multidimensional high performance liquid chromatography method coupled with amperometric detection using a boron-doped diamond electrode for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk". *Analytica Chimica Acta*. **654**(2): 127, 2009.
 97. DE PAULA, F.C.C.R.; DE PIETRO, A.C. & CASS, Q.B., "Simultaneous quantification of sulfamethoxazole and trimethoprim in whole egg samples by column-switching high-performance liquid chromatography using restricted access media column for on-line sample clean-up". *Journal of Chromatography A*. **1189**(1-2): 221, 2008.
 98. BARREIRO, J.C.; VANZOLINI, K.L.; MADUREIRA, T.V.; TIRITAN, M.E. & CASS, Q.B., "A column-switching method for quantification of the enantiomers of omeprazole in native matrices of waste and estuarine water samples". *Talanta*. **82**(1): 384, 2010.
 99. CASSIANO, N.M.; CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. & WAINER, I.W., "Determination of the plasma levels of metyrapone and its enantiomeric metyrapol metabolites by direct plasma injection and multidimensional achiral-chiral chromatography". *Chirality*. **14**(9): 731, 2002.

100. BALIZS, G. & HEWITT, A., "Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry". *Analytica Chimica Acta*. **492**(1-2): 105, 2003.
101. BEIßMANN, S.; BUCHBERGER, W.; HERTSENS, R. & KLAMPFL, C.W., "High-performance liquid chromatography coupled to direct analysis in real time mass spectrometry: Investigations on gradient elution and influence of complex matrices on signal intensities". *Journal of Chromatography A*. **1218**(31): 5180, 2011.
102. C., D.P.A. *Desenvolvimento de método cromatográfico para o controle de qualidade e para a análise de resíduos em leite bovino de medicamentos veterinários*. São Carlos, Departamento de Química, 2008.
103. NIESSEN, W.M.A., "State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. **856**(1-2): 179, 1999.
104. BRUINS, A.P., "Mechanistic aspects of electrospray ionization". *Journal of Chromatography A*. **794**(1-2): 345, 1998.
105. STEINMANN, D. & GANZERA, M., "Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **55**(4): 744, 2011.
106. KOSTIAINEN, R. & KAUPPILA, T.J., "Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. **1216**(4): 685, 2009.
107. <http://www.adorgraphics.com>. Acesso: agosto 2011.
108. MALLET, C.R.; LU, Z. & MAZZEO, J.R., "A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **18**(1): 49, 2004.
109. SANTOS NETO, A.J. *Cromatografia líquida multidimensional e espectrometria de massas em tandem para análise direta de fármacos em fluidos biológicos: da escala convencional à miniaturizada*. São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, 2007. p 216.
110. LE BIZEC, B.; PINEL, G. & ANTIGNAC, J.P., "Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. **1216**(46): 8016, 2009.
111. MAKAROV, A.; DENISOV, E.; KHOLOMEEV, A.; BALSCHUN, W.; LANGE, O.; STRUPAT, K. & HORNING, S., "Performance Evaluation of a Hybrid Linear Ion Trap/Orbitrap Mass Spectrometer". *Analytical Chemistry*. **78**(7): 2113, 2006.
112. GRACIA-LOR, E.; SANCHO, J.V. & HERNANDEZ, F., "Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals, including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. **1218**(16): 2264, 2011.
113. What type of instruments are used, <http://www.waters.com/>. Acesso: agosto 2011.
114. FEKETE, S. & FEKETE, J., "Fast gradient screening of pharmaceuticals with 5 cm long, narrow bore reversed-phase columns packed with sub-3 μ m core-shell and sub-2 μ m totally porous particles". *Talanta*. **84**(2): 416, 2011.
115. NGUYEN, D.T.T.; GUILLARME, D.; HEINISCH, S.; BARRIOULET, M.-P.; ROCCA, J.-L.; RUDAZ, S. & VEUTHEY, J.-L., "High throughput liquid chromatography with sub-2 μ m particles at high pressure and high temperature". *Journal of Chromatography A*. **1167**(1): 76, 2007.

116. YANG, Y.H., C. CRAIG, "Assay transfer from HPLC to UPLC for higher analysis throughput". *Separation Science Redefined*: 31, 2005.
117. JASTREBOVA, J.; STRANDLER, H.; PATRING, J. & WIKLUND, T., "Comparison of UPLC and HPLC for Analysis of Dietary Folates". *Chromatographia*. **73**(3): 219, 2011.
118. DE VILLIERS, A.; LESTREMAU, F.; SZUCS, R.; GÉLÉBART, S.; DAVID, F. & SANDRA, P., "Evaluation of ultra performance liquid chromatography: Part I. Possibilities and limitations". *Journal of Chromatography A*. **1127**(1-2): 60, 2006.
119. NOVÁKOVÁ, L.; MATYSOVÁ, L. & SOLICH, P., "Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis". *Talanta*. **68**(3): 908, 2006.
120. WANG, F.; CHEN, J.; CHENG, H.; TANG, Z.; ZHANG, G.; NIU, Z.; PANG, S.; WANG, X. & LEE, F.S.-C., "Multi-residue method for the confirmation of four avermectin residues in food products of animal origin by ultra-performance liquid chromatography "tandem mass spectrometry". *Food Additives & Contaminants: Part A*. **28**(5): 627, 2011.
121. CHEN, X.-B.; WU, Y.-L. & YANG, T., "Simultaneous determination of clenbuterol, chloramphenicol and diethylstilbestrol in bovine milk by isotope dilution ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography B*. **879**(11-12): 799, 2011.
122. LIU, C.; WANG, H.; JIANG, Y. & DU, Z., "Rapid and simultaneous determination of amoxicillin, penicillin G, and their major metabolites in bovine milk by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography B*. **879**(7-8): 533, 2011.
123. FRENICH, A.G.; VIDAL, J.L.M.; AGUILERA-LUIZ, M.M. & ROMERO-GONZALEZ, R., "Development of fast screening methods for the analysis of veterinary drug residues in milk by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **397**(7): 2777, 2010.
124. WHELAN, M.; KINSELLA, B.; FUREY, A.; MOLONEY, M.; CANTWELL, H.; LEHOTAY, S.J. & DANAHER, M., "Determination of anthelmintic drug residues in milk using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with rapid polarity switching". *Journal of Chromatography A*. **1217**(27): 4612, 2010.
125. YANG, F.; LIU, Z.; LIN, Y.; CHEN, J.; PANG, G. & CHEN, G., "Development an UHPLC-MS/MS Method for Detection of β -Agonist Residues in Milk". *Food Analytical Methods*: 1, 2011.
126. LI, C.; WU, Y.-L.; YANG, T.; ZHANG, Y. & HUANG-FU, W.-G., "Simultaneous determination of clenbuterol, salbutamol and ractopamine in milk by reversed-phase liquid chromatography tandem mass spectrometry with isotope dilution". *Journal of Chromatography A*. **1217**(50): 7873, 2010.
127. NAGY, K.L.; REDEUIL, K.; BERTHOLET, R.; STEILING, H. & KUSSMANN, M., "Quantification of Anthocyanins and Flavonols in Milk-Based Food Products by Ultra Performance Liquid Chromatography~Tandem Mass Spectrometry". *Analytical Chemistry*. **81**(15): 6347, 2009.
128. XIA, X.; DONG, Y.; LUO, P.; WANG, X.; LI, X.; DING, S. & SHEN, J., "Determination of benzimidazole residues in bovine milk by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography B*. **878**(30): 3174, 2011.
129. STOLKER, A.; RUTGERS, P.; OOSTERINK, E.; LASAROMS, J.; PETERS, R.; VAN RHIJN, J. & NIELEN, M., "Comprehensive screening and quantification

- of veterinary drugs in milk using UPLC–ToF-MS". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **391**(6): 2309, 2008.
130. SHAO, B.; ZHANG, J.; YANG, Y.; MENG, J.; WU, Y. & DUAN, H., "Simultaneous analysis of thirteen diuretics residues in bovine milk by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **22**(21): 3427, 2008.
 131. ZHANG, H.; REN, Y. & BAO, X., "Simultaneous determination of (fluoro)quinolones antibacterials residues in bovine milk using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **49**(2): 367, 2009.
 132. CUI, X.; SHAO, B.; ZHAO, R.; YANG, Y.; HU, J. & TU, X., "Simultaneous determination of seventeen glucocorticoids residues in milk and eggs by ultra-performance liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **20**(15): 2355, 2006.
 133. BRADFORD, M.M., "Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding". *Analytical Biochemistry*. **72**(1-2): 248, 1976.
 134. LIMA, V.V., "Colunas de Acesso Restrito e Biorreatores de Enzimas GAPDH: Desenvolvimento e Aplicação em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência". *Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar. Tese de Doutorado*: 173p., 2004.
 135. TANAKA, H.; TAKAHASHI, K. & OHIRA, M., "Characterization of an avidin-bonded column for direct injection in reversed-phase high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*. **869**(1-2): 151, 2000.
 136. HAN, X.X.; XIE, Y.; ZHAO, B. & OZAKI, Y., "Highly Sensitive Protein Concentration Assay over a Wide Range via Surface-Enhanced Raman Scattering of Coomassie Brilliant Blue". *Analytical Chemistry*. **82**(11): 4325, 2010.
 137. BANIK, S.P.; PAL, S.; GHORAI, S.; CHOWDHURY, S. & KHOWALA, S., "Interference of sugars in the Coomassie Blue G dye binding assay of proteins". *Analytical Biochemistry*. **386**(1): 113, 2009.
 138. YU, Z.X.; WESTERLUND, D. & BOOS, K.S., "Evaluation of liquid chromatographic behavior of restricted-access media precolumns in the course of direct injection of large volumes of plasma samples in column-switching systems". *Journal of Chromatography B*. **704**(1-2): 53, 1997.
 139. CASS, Q.B.; CASSIANO, N.M.; BARREIRO, J.C.; MORAES, M.C. & OLIVEIRA, R.V., "Restricted access media supports for direct high-throughput analysis of biological fluid samples: review of recent applications". *Bioanalysis*. **1**(3): 577, 2009.
 140. SCOTT, R.P.W., *Ion Chromatography*. 2007: Library4Science Publisher.
 141. CHIAP, P.; RBEIDA, O.; CHRISTIAENS, B.; HUBERT, P.; LUBDA, D.; BOOS, K.S. & CROMMEN, J., "Use of a novel cation-exchange restricted-access material for automated sample clean-up prior to the determination of basic drugs in plasma by liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*. **975**(1): 145, 2002.
 142. RBEIDA, O.; CHRISTIAENS, B.; CHIAP, P.; HUBERT, P.; LUBDA, D.; BOOS, K.S. & CROMMEN, J., "Fully automated LC method for the determination of sotalol in human plasma using restricted access material with cation exchange properties for sample clean-up". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **32**(4-5): 829, 2003.

143. YAMAMOTO, E.; SAKAGUCHI, T.; KAJIMA, T.; MANO, N. & ASAKAWA, N., "Novel methylcellulose-immobilized cation-exchange precolumn for on-line enrichment of cationic drugs in plasma". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **807**(2): 327, 2004.
144. KAWANO, S.; TAKAHASHI, M.; HINE, T.; YAMAMOTO, E. & ASAKAWA, N., "On-line pretreatment using methylcellulose-immobilized cation-exchange restricted access media for direct liquid chromatography/mass spectrometric determination of basic drugs in plasma". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **19**(19): 2827, 2005.
145. YAMAMOTO, E.; TAKAKUWA, S.; KATO, T. & ASAKAWA, N., "Sensitive determination of aspirin and its metabolites in plasma by LC-UV using on-line solid-phase extraction with methylcellulose-immobilized anion-exchange restricted access media". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **846**(1-2): 132, 2007.
146. SATO, Y.; YAMAMOTO, E.; TAKAKUWA, S.; KATO, T. & ASAKAWA, N., "Weak cation-exchange restricted-access material for on-line purification of basic drugs in plasma". *Journal of Chromatography A*. **1190**(1-2): 8, 2008.
147. KHALIL, N.Y., "A highly sensitive HPLC method with automated on-line sample pre-treatment and fluorescence detection for determination of reboxetine in human plasma". *Talanta*. **80**(3): 1251, 2010.
148. 2D HPLC for Bioanalysis (Co-Sense for BA), http://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=2dhplc_bioanalysis. Acesso: agosto 2011
149. MALEROD, H.; LUNDANES, E. & GREIBROKK, T., "Recent advances in on-line multidimensional liquid chromatography". *Analytical Methods*. **2**(2): 110, 2010.
150. BOPANA, V.K.; MILLER-STEIN, C. & SCHAEFER, W.H., "Direct plasma liquid chromatographic-tandem mass spectrometric analysis of granisetron and its 7-hydroxy metabolite utilizing internal surface reversed-phase guard columns and automated column switching devices". *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **678**(2): 227, 1996.
151. BOPANA, V., "Fast LC/MS/MS methods using Restricted Access Media (RAM) guard columns & switching valves". *Drug Delivery Technology*. **10**(8): 56, 2010.
152. ICERI, T.M. *Avaliação sistemática do efeito de matriz em ensaios bioanalíticos por LC-MS/MS para a análise de rifampicina em fluidos biológicos*. São Carlos, Departamento de Química, 2011.
153. HERMANSSON, J. & GRAHN, A., "Determination of drugs by direct injection of plasma into a biocompatible extraction column based on a protein-entrapped hydrophobic phase". *Journal of Chromatography A*. **660**(1-2): 119, 1994.
154. HERMANSSON, J.; GRAHN, A. & HERMANSSON, I., "Direct injection of large volumes of plasma/serum on a new biocompatible extraction column for the determination of atenolol, propranolol and ibuprofen: Mechanisms for the improvement of chromatographic performance". *Journal of Chromatography A*. **797**(1-2): 251, 1998.
155. EL MAHJOUR, A. & STAUB, C., "High-performance liquid chromatography determination of flunitrazepam and its metabolites in plasma by use of column-switching technique: comparison of two extraction columns". *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **754**(2): 271, 2001.

156. YU, Z. & WESTERLUND, D., "Characterization of the precolumn BioTrap 500 C18 for direct injection of plasma samples in a column-switching system". *Chromatographia*. **47**(5-6): 299, 1998.
157. BREINDAHL, T.; SIMONSEN, O. & ANDREASEN, K., "Column-switching HPLC-MS/MS analysis of ropivacaine in serum, ultrafiltrate and drainage blood for validating the safety of blood reinfusion". *Journal of Chromatography B*. **878**(1): 76, 2010.
158. FRIEDRICH, G.; ROSE, T. & RISSLER, K., "Determination of testosterone metabolites in human hepatocytes: I. Development of an on-line sample preparation liquid chromatography technique and mass spectroscopic detection of 6[beta]-hydroxytestosterone". *Journal of Chromatography B*. **784**(1): 49, 2003.
159. BOTARO, B.G.D.L., Y.V.R.; AQUINO, A.A.; FERNANDES, R.H.R.; GARCIA, J.F.; SANTOS, M. V., "Polimorfismo da beta-lactoglobulina e estabilidade do leite bovino". *Pesq. Agropec. bras.* **42**(5): 747, 2007.
160. BROWNLOW, S.; CABRAL, J.H.M.; COOPER, R.; FLOWER, D.R.; YEWDALL, S.J.; POLIKARPOV, I.; NORTH, A.C.T. & SAWYER, L., "Bovine beta-lactoglobulin at 1.8 angstrom resolution - Still an enigmatic lipocalin". *Structure*. **5**(4): 481, 1997.
161. ANTUNES, A.J., *Funcionalidades de Proteínas do Soro de Leite Bovino*. 2003, Barueri, SP.
162. GUILLARME, D.; RUTA, J.; RUDAZ, S. & VEUTHEY, J.L., "New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **397**(3): 1069, 2010.
163. KRUBE, A.; HERODES, K. & LEITO, I., "Accounting for matrix effects of pesticide residue liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometric determination by treatment of background mass spectra with chemometric tools". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **25**(9): 1159, 2011.
164. NGUYEN, D.T.T.; GUILLARME, D.; RUDAZ, S. & VEUTHEY, J.-L., "Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure". *Journal of Separation Science*. **29**(12): 1836, 2006.
165. GRITTI, F. & GUIOCHON, G., "On the extra-column band-broadening contributions of modern, very high pressure liquid chromatographs using 2.1 mm I.D. columns packed with sub-2 [μ]m particles". *Journal of Chromatography A*. **1217**(49): 7677, 2010.
166. WU, N.; LIU, Y. & LEE, M.L., "Sub-2 [μ]m porous and nonporous particles for fast separation in reversed-phase high performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*. **1131**(1-2): 142, 2006.
167. DEL MAR RAMÍREZ FERNÁNDEZ, M.; WILLE, S.M.R.; DI FAZIO, V.; GOSSELIN, M. & SAMYN, N., "Analysis of amphetamines and metabolites in urine with ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography B*. **878**(19): 1616, 2010.
168. WU, T.; WANG, C.; WANG, X.; XIAO, H.Q.; MA, Q. & ZHANG, Q., "Comparison of UPLC and HPLC for Analysis of 12 Phthalates". *Chromatographia*. **68**(9-10): 803, 2008.
169. ORTEGA, N.; ROMERO, M.-P.; MACIÀ, A.; REGUANT, J.; ANGLÈS, N.; MORELLÓ, J.-R. & MOTILVA, M.-J., "Comparative study of UPLC-MS/MS and HPLC-MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples". *Journal of Food Composition and Analysis*. **23**(3): 298, 2010.

170. LEANDRO, C.C.; HANCOCK, P.; FUSSELL, R.J. & KEELY, B.J., "Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of priority pesticides in baby foods by tandem quadrupole mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. **1103**(1): 94, 2006.
171. CHURCHWELL, M.I.; TWADDLE, N.C.; MEEKER, L.R. & DOERGE, D.R., "Improving LC-MS sensitivity through increases in chromatographic performance: Comparisons of UPLC-ES/MS/MS to HPLC-ES/MS/MS". *Journal of Chromatography B*. **825**(2): 134, 2005.
172. ZUNIGA, A. & LI, L.A., "Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for comprehensive analysis of urinary acylcarnitines". *Analytica Chimica Acta*. **689**(1): 77, 2011.
173. LIANG, L.L.; WAN, S.H.; XIAO, J.F.; ZHANG, J.J. & GU, M.N., "Rapid UPLC-MS/MS method for the determination of sufentanil in human plasma and its application in target-controlled infusion system". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **54**(4): 838, 2011.
174. HEINIG, K.; WIRZ, T.; BUCHELI, F.; MONIN, V. & GLOGE, A., "Sensitive determination of a pharmaceutical compound and its metabolites in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with on-line solid-phase extraction". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **54**(4): 742, 2011.
175. SCHAPPLER, J.; NICOLI, R.; NGUYEN, D.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. & GUILLARME, D., "Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with single quadrupole mass spectrometry for the analysis of a complex drug mixture". *Talanta*. **78**(2): 377, 2009.
176. CACCIOLA, F.; DELMONTE, P.; JAWORSKA, K.; DUGO, P.; MONDELLO, L. & RADER, J.I., "Employing ultra high pressure liquid chromatography as the second dimension in a comprehensive two-dimensional system for analysis of *Stevia rebaudiana* extracts". *Journal of Chromatography A*. **1218**(15): 2012, 2011.
177. ZHAO, Y.; CHEN, P.; LIN, L.; HARNLY, J.M.; YU, L. & LI, Z., "Tentative identification, quantitation, and principal component analysis of green pu-erh, green, and white teas using UPLC/DAD/MS". *Food Chemistry*. **126**(3): 1269, 2011.
178. LI, Y.; ZHANG, T.; ZHANG, X.; XU, H. & LIU, C., "Chemical fingerprint analysis of *Phellodendri Amurensis* Cortex by ultra performance LC/Q-TOF-MS methods combined with chemometrics". *Journal of Separation Science*. **33**(21): 3347, 2010.
179. BAKER, D.R. & KASPRZYK-HORDERN, B., "Multi-residue analysis of drugs of abuse in wastewater and surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography-positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. **1218**(12): 1620, 2011.
180. LI, C.; WU, Y.-L.; YANG, T. & ZHANG, Y., "Determination of Metaldehyde in Water by SPE and UPLC-MS-MS". *Chromatographia*. **72**(9): 987, 2010.
181. KOVALCZUK, T.; JECH, M.; POUSTKA, J. & HAJSLOVA, J., "Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A novel challenge in multiresidue pesticide analysis in food". *Analytica Chimica Acta*. **577**(1): 8, 2006.
182. TAYLOR, M.J.; HUNTER, K.; HUNTER, K.B.; LINDSAY, D. & LE BOUHELLEC, S., "Multi-residue method for rapid screening and confirmation of pesticides in crude extracts of fruits and vegetables using isocratic liquid chromatography

- with electrospray tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. **982**(2): 225, 2002.
183. GUILLARME, D.; CASSETTA, C.; BICCHI, C. & VEUTHEY, J.-L., "High throughput qualitative analysis of polyphenols in tea samples by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to UV and mass spectrometry detectors". *Journal of Chromatography A*. **1217**(44): 6882, 2010.
 184. EPRIIATI, I.; KERVEN, G.; D'ARCY, B. & GIDLEY, M.J., "Chromatographic analysis of diverse fruit components using HPLC and UPLC". *Analytical Methods*. **2**(10): 1606, 2010.
 185. GUILLARME, D.; SCHAPPLER, J.; RUDAZ, S. & VEUTHEY, J.-L., "Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **29**(1): 15, 2010.
 186. KIVILOMPOLO, M. & HYÖTYLÄINEN, T., "Comparison of separation power of ultra performance liquid chromatography and comprehensive two-dimensional liquid chromatography in the separation of phenolic compounds in beverages". *Journal of Separation Science*. **31**(19): 3466, 2008.
 187. MALDANER, L. & JARDIM, I.C.S.F., "O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência". *Química Nova*. **32**: 214, 2009.
 188. GOSETTI, F.; MAZZUCCO, E.; ZAMPIERI, D. & GENNARO, M.C., "Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. **1217**(25): 3929, 2010.
 189. MARÍN, J.M.; GRACIA-LOR, E.; SANCHO, J.V.; LÓPEZ, F.J. & HERNÁNDEZ, F., "Application of ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the determination of multi-class pesticides in environmental and wastewater samples: Study of matrix effects". *Journal of Chromatography A*. **1216**(9): 1410, 2009.
 190. TRUFELLI, H.; PALMA, P.; FAMIGLINI, G. & CAPPIELLO, A., "An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry". *Mass Spectrometry Reviews*. **30**(3): 491, 2011.
 191. SHAH, V.; MIDHA, K.; FINDLAY, J.; HILL, H.; HULSE, J.; MCGILVERAY, I.; MCKAY, G.; MILLER, K.; PATNAIK, R.; POWELL, M.; TONELLI, A.; VISWANATHAN, C.T. & YACOBI, A., "Bioanalytical Method Validation—A Revisit with a Decade of Progress". *Pharmaceutical Research*. **17**(12): 1551, 2000.
 192. VAN DE STEENE, J.C. & LAMBERT, W.E., "Comparison of Matrix Effects in HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS Analysis of Nine Basic Pharmaceuticals in Surface Waters". *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. **19**(5): 713, 2008.
 193. NAKAMURA, M., "Analyses of benzodiazepines and their metabolites in various biological matrices by LC-MS(/MS)". *Biomedical Chromatography*. **25**(12): 1283-1307, 2011.
 194. ANNESLEY, T.M., "Ion suppression in mass spectrometry". *Clinical Chemistry*. **49**(7): 1041, 2003.
 195. VAN EECKHAUT, A.; LANCKMANS, K.; SARRE, S.; SMOLDERS, I. & MICHOTTE, Y., "Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects". *Journal of Chromatography B*. **877**(23): 2198, 2009.
 196. 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 Communications in Mass Spectrometry*. **13**(12): 1175, 1999.

197. ARAUJO, P., "Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation". *Journal of Chromatography B*. **877**(23): 2224, 2009.
198. SAAR, E.; GEROSTAMOULOS, D.; DRUMMER, O. & BEYER, J., "Comparison of extraction efficiencies and LC-MS-MS matrix effects using LLE and SPE methods for 19 antipsychotics in human blood". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **393**(2): 727, 2009.
199. MARCHI, I.; RUDAZ, S. & VEUTHEY, J.-L., "Sample preparation development and matrix effects evaluation for multianalyte determination in urine". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **49**(2): 459, 2009.
200. MARCHI, I.; VIETTE, V.; BADOUD, F.; FATHI, M.; SAUGY, M.; RUDAZ, S. & VEUTHEY, J.-L., "Characterization and classification of matrix effects in biological samples analyses". *Journal of Chromatography A*. **1217**(25): 4071,
201. ISMAIEL, O.A.; ZHANG, T.Y.; JENKINS, R.G. & KARNES, H.T., "Investigation of endogenous blood plasma phospholipids, cholesterol and glycerides that contribute to matrix effects in bioanalysis by liquid chromatography/mass spectrometry". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **878**(31): 3303, 2010.
202. STERNER, J.L.; JOHNSTON, M.V.; NICOL, G.R. & RIDGE, D.P., "Signal suppression in electrospray ionization Fourier transform mass spectrometry of multi-component samples". *Journal of Mass Spectrometry*. **35**(3): 385, 2000.
203. RBEIDA, O.; CHIAP, P.; LUBDA, D.; BOOS, K.S.; CROMMEN, J. & HUBERT, P., "Development and validation of a fully automated LC method for the determination of cloxacillin in human plasma using anion exchange restricted access material for sample clean-up". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **36**(5): 961, 2005.
204. TILLER, P.R. & ROMANYSHYN, L.A., "Implications of matrix effects in ultra-fast gradient or fast isocratic liquid chromatography with mass spectrometry in drug discovery". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **16**(2): 92, 2002.
205. MULLER, C.; SCHAFFER, P.; STORTZEL, M.; VOGT, S. & WEINMANN, W., "Ion suppression effects in liquid chromatography-electrospray-ionisation transport-region collision induced dissociation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis with mass spectra libraries". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **773**(1): 47, 2002.
206. CHOI, B.K.; HERCULES, D.M. & GUSEV, A.I., "Effect of liquid chromatography separation of complex matrices on liquid chromatography-tandem mass spectrometry signal suppression". *Journal of Chromatography A*. **907**(1-2): 337, 2001.
207. PUCCI, V.; DI PALMA, S.; ALFIERI, A.; BONELLI, F. & MONTEAGUDO, E., "A novel strategy for reducing phospholipids-based matrix effect in LC-ESI-MS bioanalysis by means of HybridSPE". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **50**(5): 867, 2009.
208. *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*, RE n 899 de maio de 2003.
209. *Guia de validação de procedimentos analíticos e controle de qualidade*, 2011.
210. CASSIANO, N.B.J.C.M., L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B., "Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas." *Química Nova*. **32**(4): 1021 2009.