



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DANIEL DA MOTA CASTELO BRANCO

**Desenvolvimento racional de métodos bioanalíticos por cromatografia líquida de alta
eficiência acoplada à espectrometria de massas**

Recife – PE
Fevereiro, 2015

DANIEL DA MOTA CASTELO BRANCO

Desenvolvimento racional de métodos bioanalíticos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produção e Controle de Medicamentos

Orientador: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana

Co-orientador: Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor

Recife – PE

2015

Catalogação na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

C349d Castelo Branco, Daniel da Mota.
Desenvolvimento racional de métodos bioanalíticos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas / Daniel da Mota Castelo Branco. – 2015.
94 f: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Davi Pereira de Santana.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2015.

Inclui referências.

1. Cromatografia líquida. 2. Espectrometria de massas. 3. Extração líquido-líquido. I. Santana, Davi Pereira de (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2017-273)

DANIEL DA MOTA CASTELO BRANCO

**Desenvolvimento racional de métodos bioanalíticos por cromatografia líquida de alta
eficiência acoplada à espectrometria de massas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal de Pernambuco, como
requisito parcial à obtenção do título de Mestre
em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 23/02/2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Davi Pereira de Santana
Universidade Federal de Pernambuco
Orientador - Presidente

Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor
Universidade Federal de Pernambuco
Co-orientador

Prof^a. Dr^a. Mônica Felts de La Roca Soares
Universidade Federal de Pernambuco
Examinador Externo 1

Prof^a. Dr^a. Maria Fernanda Pimentel Avelar
Universidade Federal
Examinador Externo 2

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Reitor

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice – Reitor

Silvio Romero de Barros Marques

Diretor de Ciências da Saúde – CCS

Nicodemos Teles de Pontes Filho

Vice – Diretor do Centro de Ciências da Saúde - CCS

Vânia Pinheiro Ramos

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Antonio Rodolfo de Faria

Vice – Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Elba Lúcia Cavalcanti Amorim

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Almir Gonçalves Wanderley

Vice - Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Ana Cristina Lima Leite

Aos meus pais pelo exemplo, dedicação e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido disposição, coragem e determinação para realização deste trabalho.

Aos meus pais, Flávio e Ladjane, e meu irmão, Rafael, por todo o apoio, dedicação e carinho. Sempre serei grato por tudo!

A Andrea, aos meus irmãos de coração, Cacá e Mariana, e a todos os meus familiares, que muito me incetivaram durante toda essa jornada.

Ao Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor, meu (co)orientador, por todas as oportunidades, confiança e paciência.

Ao Prof. Dr. Davi Pereira de Santana, meu orientador, por todo o suporte durante a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Fernanda Pimentel Avelar, pela colaboração durante a fase inicial do trabalho.

Aos meus amigos, Charles, Gevanio, Danilo, Eduardo, Jamerson, Lucas, Priscylla, Marlene, Nayara, e William por todos os momentos divertidos e memoráveis.

Aos meus amigos do NUDFAC, Karine, Noely, Giovana, Ellison, Anellyse e Thalita pela amizade e companheirismo. Vocês foram essenciais para a realização deste trabalho!

A Alice, a quem eu sou imensamente grato, por todo o incentivo e amizade.

Marília, Zênia e Eduardo, por todos os ensinamentos, ajuda e companheirismo durante esses anos.

A Atamai, Camila, Diego, Cecília, Éllida que também contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários do PPGCF-UFPE.

A FACEPE pela concessão da bolsa.

RESUMO

CASTELO BRANCO, D. M. **Desenvolvimento racional de métodos bioanalíticos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas**. 2015. 91 f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

No âmbito da bioanálise, frequentemente é requerido o desenvolvimento de métodos bioanalíticos seletivos e sensíveis. Atualmente, a técnica mais amplamente utilizada para quantificar compostos em matrizes biológicas é a cromatografia líquida associada à espectrometria de massas em série (CLAE-EM/EM) por reunir as características de alta seletividade e alta sensibilidade, além de proporcionar métodos com tempo de análise relativamente curto. Porém, a abordagem usualmente utilizada no desenvolvimento de métodos por CLAE-EM/EM é a de “tentativa e erro”, elevando o custo do processo. Em contrapartida, a técnica de planejamento de experimentos aliada à metodologia de superfície de resposta oferece uma maneira eficiente de conduzir os experimentos e, assim, obter mais informações sobre a relação entre os diversos fatores e as respostas do sistema de CLAE-EM/EM. O objetivo deste estudo foi desenvolver um procedimento sistemático, utilizando as técnicas de planejamento experimental e superfície de resposta, visando à obtenção de métodos bioanalíticos por CLAE-EM/EM de uma forma eficiente. O procedimento proposto foi aplicado no desenvolvimento de um método bioanalítico modelo para quantificação de olanzapina (OLZ) e quetiapina (QTP) em plasma humano, utilizando a venlafaxina (VLX) como padrão interno. O método obtido foi composto de uma coluna HILIC 100 x 2,1 mm, 2,6 µm Phenomenex[®], fase móvel acetonitrila (ACN):formato de amônio 10 mmol/L (85,5:14,5), fluxo 0,2 mL/min, além de um espectrômetro de massas triplo quadrupolo no modo MRM monitorando as transições (MRM) 313>256 (OLZ), 384>253 (QTP) e 278>260 (VLX). O método desenvolvido apresentou a total separação cromatográfica dos picos da olanzapina, quetiapina e venlafaxina, além de um incremento médio de área para os analitos de aproximadamente 50% em comparação com a metodologia de otimização univariada, tradicionalmente empregada. Além disso, foi desenvolvido um método de extração líquido-líquido com uma eficiência de processo superior a 70% para todos os fármacos.

Palavras-chave: Cromatografia líquida. Espectrometria de massas. Extração líquido-líquido.

ABSTRACT

CASTELO BRANCO, D. M. **Rational development of bioanalytical high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods.** 2015. 91 f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

In the context of bioanalysis, it is often required the development of selective and sensitive bioanalytical methods. Currently, the most widely used technique to quantify compounds in biological matrices is liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) by bringing together high selectivity and high sensitivity characteristics, and provide methods with analysis time relatively short. However, the approach commonly used in the development of LC-MS/MS methods is the "trial and error", enhancing the cost of the process. On the other hand, the experimental design technique combined with response surface methodology provides an efficient way to conduct experiments and thus more information on the relationship between the several factors and responses of the LC-MS/MS system. The aim of this study was to develop a systematic procedure, using the techniques of experimental design and response surface, in order to obtain bioanalytical methods by LC-MS/MS efficiently. The proposed method was applied in developing a model bioanalytical method for the quantification of olanzapina (OLZ) and quetiapine (QTP) in human plasma, using venlafaxine (VLX) as an internal standard. The LC-MS/MS method utilizes a Phenomenex HILIC 100 x 2,1 mm, 2,6 µm, mobile phase acetonitrile (ACN):ammonium formate 10 mmol/L and a triple quadrupole mass spectrometry in a MRM mode monitoring the following transitions 313>256 (OLZ) 384>256 (VLX) and 278>260 (VLX). The developed method showed a total chromatographic peak separation of olanzapine, quetiapine and venlafaxine, and an average increase in area for the analytes of approximately 50% compared to traditional optimization methodology employed. In addition, an liquid-liquid extraction method has been developed which presented a process 70% higher efficiency for all drug.

Key-words: Liquid chromatography. Mass spectrometry. Liquid-liquid extraction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Componentes essenciais de um sistema de CLAE.....	25
Figura 2: Componentes do espectrômetro de massas e suas diversas técnicas.....	29
Figura 3: Esquema relacionando as técnicas de ionização à pressão atmosférica com o peso molecular e a polaridade dos composto	30
Figura 4: Representação esquemática de uma fonte de ionização por eletronebulização.....	31
Figura 5: Representação do mecanismo da técnica de ionização por eletronebulização.....	32
Figura 6: Esquema de um analisador quadrupolar.....	32
Figura 7: Modo de operação SRM.....	33
Figura 8: Esquema geral de um processo em um sitema. As variáveis controláveis estão representadas por “x”, as variáveis não controláveis por “z” e a resposta por “y”.....	35
Figura 9: Matriz de coeficientes de contraste para um planejamento fatorial 2^3	39
Figura 10: Exemplos de planejamentos compostos centrais	41
Figura 11: Estrutura química da olanzapina.....	45
Figura 12: Estrutura química da quetiapina	46
Figura 13: Fluxograma da estratégia de otimização utilizada neste estudo	54
Figura 14: Representação esquemática da configuração do sistema no experimento de reavalição dos valores de DP	58
Figura 15- Moléculas de olanzapina (A), quetiapina (B) e venlafaxina (C) protonadas	64
Figura 16: Gráfico de resíduos modelo ajustado para RQTP,VLX.	69
Figura 17: Curva de nível para $(RQTP,VLX)^{1/2}$	71
Figura 18: Curva de nível obtida para $(RVLX,OLZ)^{1/2}$	73
Figura 19: Curva de nível obtida para $t_{R,OLZ}$	74
Figura 20: Curva de nível obtida pela sobreposição das curvas da etapa cromatográfica.....	75
Figura 21: Cromatograma obtido após a etapa de otimização cromatográfica.....	75
Figura 22: Curvas de níveis obtidas para a área da olanzapina.....	82
Figura 23: Representação gráfica da variação de intensidade da olanzapina (cps) em função do declustering potencial.....	83
Figura 24: Representação boxplot da comparação das áreas obtidas através das abordagens univariada e multivariada para OLZ e QTP.....	84

Figura 25: Variação das respostas com os níveis de pH e tipo de solvente.....	86
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diferentes modos de CLAE	26
Tabela 2: Alíquotas retiradas soluções A e B para preparo de 10 mL de soluções tampão de formato de amônio 0,1 mol L ⁻¹ com diferentes valores de pH.....	53
Tabela 3: Planejamento composto central de face centrada utilizado na etapa de otimização cromatográfica.	56
Tabela 4: Níveis investigados dos fatores posição da sonda X e Y.....	57
Tabela 5: Planejamento fatorial 2 ⁵⁻¹ realizado na etapa de otimização da fonte de ionização.	58
Tabela 6: Planejamento fatorial 3 ² realizado na etapa de desenvolvimento do método de extração.	59
Tabela 7: Resultados da comparação das técnicas de ionização IEN x IQAP.	65
Tabela 8: Valores dos parâmetros do EM-EM obtidos através da otimização automática.	65
Tabela 9: Resultados do planejamento composto central.....	67
Tabela 10: Tabela dos coeficientes do modelo ajustado para $R_{QTP,VLX}$. Onde (L) representam os termos lineares e (Q) representam os termos quadráticos.....	68
Tabela 11: ANOVA do modelo ajustado para $R_{QTP,VLX}$	68
Tabela 12: Coeficientes do modelo quadrático inicial para $(R_{QTP,VLX})^{1/2}$	69
Tabela 13: ANOVA do modelo quadrático inicial para $(R_{QTP,VLX})^{1/2}$	70
Tabela 14: ANOVA do novo modelo quadrático para $(R_{QTP,VLX})^{1/2}$	70
Tabela 15: Coeficientes do novo modelo quadrático para $(R_{QTP,VLX})^{1/2}$	71
Tabela 16: ANOVA do modelo obtido para $(R_{VLX,OLZ})^{1/2}$	72
Tabela 17: Coeficientes do modelo obtido para $(R_{VLX,OLZ})^{1/2}$	72
Tabela 18: ANOVA do modelo obtido para $t_{R,OLZ}$	73
Tabela 19: Coeficientes do modelo obtido para $t_{R,OLZ}$	74
Tabela 20: Resultados do experimento de otimização da geometria da fonte.....	76
Tabela 21: ANOVA realizada para o fator sonda X.....	76
Tabela 22: ANOVA realizada para o fator sonda Y.....	76
Tabela 23: Resultados do planejamento fatorial fracionário 2 ⁵⁻¹ para otimização dos parâmetros clássicos da fonte de ionização.....	77
Tabela 24: Coeficientes do modelo de segunda ordem ajustado para área OLZ.....	78

Tabela 25: Contribuições dos termos de primeira e segunda ordem para a soma quadrática total.	78
Tabela 26: Experimentos seguindo o caminho de máxima inclinação. E1-ensaio 1, E2-ensaio 2; E3-ensaio 3; E4-ensaio 4; E5-ensaio 5; E6-ensaio 6.	79
Tabela 27: Nova matriz de planejamento para otimização dos parâmetros da fonte de ionização.	80
Tabela 28: ANOVA do modelo ajustado para a área da olanzapina.	81
Tabela 29: Coeficientes do modelo ajustado para a área da olanzapina.	82
Tabela 30: Resultados da comparação entre os métodos de otimização.	84
Tabela 31: Resultados do planejamento 3^2 para desenvolvimento do processo de extração.	85

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila
Ar - Argônio
CAD - Pressão do gás de colisão
CE - Energia de colisão
CEP - *Cell entrance potencial*
CI – Ionização química
CG - Cromatografia Gasosa
CLAE-EM - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas
CLAE-EM/EM - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em série
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-UV - Cromatografia Líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta
CUR - *Curtain gás*
CXP - *Cell exit potencial*
DC – Corrente direta
DOE - *Design of experiments*
DP - *Declustering potencial*
ELL - Extração Líquido-Líquido
EI – Ionização por elétrons
EP - Eficiência de processo
EP - *Entrance potencial*
FAB - Fast atom bombardment
FDA - *Food and Drug Administration*
FIPA - Fotoionização à pressão atmosférica
G.L. - Graus de liberdade
GS1 - Gás nebulizador
GS2 - Gás secante
He - Hélio
HILIC - Cromatografia de interação hidrofílica
IEN - Ionização por Eletronebulização
IEN - Ionização por eletronebulização
IPA - Ionização à pressão atmosférica
IQPA - Ionização Química à Pressão Atmosférica
LAFEPE - Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes
MALDI - *Matrix-assisted laser desorption/ionization*
ME - Efeito matriz
MLR - Regressão Linear Múltipla
MTBE - Éter metil terc-butílico
NARP - Cromatografia de fase reversa não-aquosa
NPC - Cromatografia de fase reversa
N₂ - Nitrogênio
NUDFAC - Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético
OFAT - *One-factor-at-a-time*
OLZ - Olanzapina
PE - Eficiência do processo
pH - Potencial de hidrogênio
PTFE - Politetrafluoretileno

QTP – Quetiapina
Q1 - Primeiro quadrupolo
Q2 - Segundo quadrupolo
Q3 - Terceiro quadrupolo
RE - Recuperação
RF - Potencial de radiofrequência
RPC - Cromatografia de fase reversa
RSM - *Response surface methodology*
SCB - Sistema de classificação biofarmacêutica
SIM - *Selected ion monitoring*
SRM - *Single Reation Monitoring*
TEM - Temperatura da fonte
TOF – *Time of flight*
VLX - Venlafaxina

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem
°C - graus Celsius
E - campo elétrico
µg/mL - micrograma por mililitro
µL - microlitro
µm - micrometros
cps - centipoise por segundo
g/mol - grama por mol
kgf/cm² - kilograma-força por centímetro quadrado
kV – kilovolt
log P - coeficiente de partição octanol/água
mg - miligrama
mg/mol - miligrama por mol
mL - mililitro
mL/min - mililitro por segundo
mm - milímetros
mmol/L – milimol por litro
mol/L - mol por litro
m/z - razão massa-carga
N_{SRM} - número de transições SRM do método
ng/mL - nanograma por mililitro
psi - libra por polegada quadrada
R_s - resolução entre picos adjacentes
t_{R1} - tempo de retenção do primeiro composto eluído
t_{R2} - tempo de retenção do segundo composto eluído
V - Voltz
V/m - Voltz por metro
w_{0,5;1} - largura à meia altura do primeiro pico
w_{0,5;2} - largura à meia altura do segundo pico
W_B - largura da base do pico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1	Cromatografia líquida e alta eficiência.....	25
2.1.1	Cromatografia de interação hidrofílica.....	27
2.2	Espectrometria de massas.....	28
2.2.1	Ionização por eletronebulização.....	30
2.2.2	Triplo-quadrupolo.....	32
2.3	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.....	33
2.3.1	Desenvolvimentos de métodos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série.....	34
2.4	Planejamento de experimentos e metodologia de superfície de resposta.....	35
2.4.1	Regressão linear múltipla.....	38
2.4.2	Planejamento experimental para ajuste de um modelo de primeira ordem.....	39
2.4.3	Planejamento experimental para ajuste de um modelo de segunda ordem.....	40
2.5	Métodos de extração e <i>clean-up</i> de amostras.....	41
2.5.1	Extração líquido-líquido.....	42
2.6	Olanzapina.....	43
2.7	Quetiapina.....	45
3	OBJETIVOS.....	48
3.1	Objetivo geral.....	48
3.2	Objetivos específicos.....	48
4	METODOLOGIA.....	50
4.1	Materiais.....	50
4.2	Equipamentos.....	50
4.3	Softwares.....	50
4.4	Preparo das soluções e amostras.....	51
4.4.1	Preparo das soluções estoque e de trabalho dos fármacos.....	51
4.4.2	Preparo da solução padrão mista.....	51
4.4.3	Preparo das amostras para a realização dos experimentos preliminares.....	51
4.4.4	Amostras utilizadas na otimização cromatográfica e da fonte de ionização.....	51
4.4.5	Preparo das amostras usadas no desenvolvimento do processo de extração.....	52
4.4.6	Preparo das soluções tampão.....	52
4.5	Descrição da estratégia de otimização.....	53
4.5.1	Definição dos critérios para otimização.....	54
4.5.2	Experimentos preliminares.....	54
4.5.3	Otimização dos parâmetros cromatográficos.....	55
4.5.4	Otimização dos parâmetros da fonte de ionização.....	57
4.5.5	Reavaliação dos valores de <i>declustering potencial</i>	58
4.6	Desenvolvimento do processo de extração.....	59
4.6.1	Descrição genérica do processo de extração utilizado.....	60
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1	Definição dos critérios de otimização.....	62
5.2	Experimentos preliminares.....	63

5.3	Otimização dos parâmetros cromatográficos.....	65
5.4	Otimização dos parâmetros da fonte de ionização.....	75
5.5	Reavaliação do <i>dodeclustering</i> potencial.....	83
5.6	Comparação entre os métodos desenvolvidos.....	83
5.7	Desenvolvimento do processo de extração.....	84
6	CONCLUSÃO.....	90
	REFERÊNCIAS.....	91

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Durante o processo de desenvolvimento de novos medicamentos, algumas etapas são essenciais para garantir a sua qualidade e eficácia, por exemplo, estudos de farmacocinética, toxicocinética, bioequivalência, relação farmacocinético-farmacodinâmica. Em vista disso, é necessária a utilização de métodos bioanalíticos capazes de gerarem resultados confiáveis com relação à concentração dos fármacos, metabólitos e substâncias endógenas presentes nos fluidos e tecidos biológicos (BOOTH, 2009).

O grande desafio para quantificar fármacos em matrizes biológicas é promover a separação dos interferentes biológicos. Este fato leva à necessidade de técnicas com alta seletividade. Além disso, os níveis de fármacos nessas matrizes são de concentrações muito baixas, configurando a necessidade de técnicas muito sensíveis (BEDOR, 2007).

Uma das técnicas analíticas que ganhou extrema importância no elenco disponível para a indústria farmacêutica, pelo fato de reunir as características de alta seletividade e alta sensibilidade, foi a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM). Esse acoplamento foi possível devido ao desenvolvimento das técnicas de ionização à pressão atmosférica, como a ionização química à pressão atmosférica (IQPA) e a ionização por eletronebulização (IEN) (PEREIRA; BICALHO; LILLA, 2005).

Atualmente, a técnica mais amplamente utilizada para quantificação de fármacos em matrizes biológicas é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (CLAE-EM/EM). Essa técnica apresenta enormes vantagens, principalmente com relação à simplicidade da preparação da amostra e ao tempo de análise, normalmente inferior a cinco minutos (XU et al., 2007).

Apesar das grandes vantagens oferecidas pela CLAE-EM/EM, é imprescindível realizar o pré-tratamento das amostras de forma a evitar o chamado efeito matriz, isto é, o efeito causado por moléculas oriundas da matriz da amostra que co-eluem com o composto de interesse e interferem na sua eficiência de ionização. (VAN EECKHAUT et al., 2009).

O processo de desenvolvimento de um método bioanalítico envolve inúmeros parâmetros que podem ter um efeito sobre o desempenho do método como um todo, por exemplo, as condições escolhidas para separação, ionização e fragmentação. Consequentemente, se queremos obter um método seletivo, sensível e robusto, devemos ajustar esses parâmetros adequadamente durante o processo de otimização do método.

Ao contrário da abordagem usual de “tentativa e erro”, a utilização da técnica de planejamento experimental nos oferece uma maneira sistemática de variar diferentes parâmetros que afetam o resultado de uma análise. E, ao realizar experimentos de acordo com um plano predeterminado, conseguimos obter mais informações sobre a relação entre os diversos parâmetros e as respostas avaliadas, especialmente quando existem interações entre os parâmetros (MOBERG; BERGQUIST; BYLUND, 2006).

É preciso ressaltar que a escolha das respostas a serem estudadas é tão importante quanto o planejamento do experimento propriamente dito (BOX; DRAPER, 2007). Exemplos de diferentes critérios de otimização para avaliar a separação cromatográfica incluem a seletividade (α), resolução (R) (com ou sem considerações acerca de picos assimétricos), dentre outros (MOBERG; BERGQUIST; BYLUND, 2006).

Frequentemente, encontramos uma situação onde vários critérios precisam ser avaliados simultaneamente, por exemplo, resolução e tempo de total de análise (SUDHA; SHANMUGASUNDRAM, 2014).

Em relação ao espectrômetro de massas, o objetivo da otimização é geralmente maximizar a intensidade do sinal ou a relação sinal-ruído do íon de interesse. Entretanto, no que concerne a hifenização CLAE-EM/EM, o critério de otimização não é óbvio; pois, geralmente, encontramos circunstâncias em que os parâmetros cromatográficos influenciam diretamente na intensidade do sinal do detector (KOSTIĆ et al., 2013).

O intento deste estudo é apresentar um procedimento sistemático, utilizando as técnicas de planejamento experimental, para ser aplicado no processo de desenvolvimento e otimização de métodos bioanalíticos por CLAE-EM/EM. Os objetivos desse procedimento são garantir uma adequada separação cromatográfica dos analitos e obter uma alta intensidade de sinal para os fragmentos dos respectivos analitos, e assim, desenvolver um método seletivo e sensível de maneira mais eficiente e confiável, evitando assim testes desnecessários que consumiriam tempo e consumíveis.

Em virtude do fato de aproximadamente 70% dos fármacos serem compostos polares de caráter básico, classe de substâncias de especial interesse para a cromatografia por apresentar propriedades que suscitam dificuldades para o analista (MCCALLEY, 2010), foram escolhidos como analitos modelos os fármacos olanzapina e quetiapina, além da venlafaxina, utilizada como padrão interno.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência é um método de separação que tem sido amplamente utilizado em vários ramos da ciência e tecnologia, por apresentar inúmeras características atrativas tais como versatilidade e alta precisão (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). Na Figura 1, está apresentado um modelo esquemático dos componentes essenciais da CLAE.

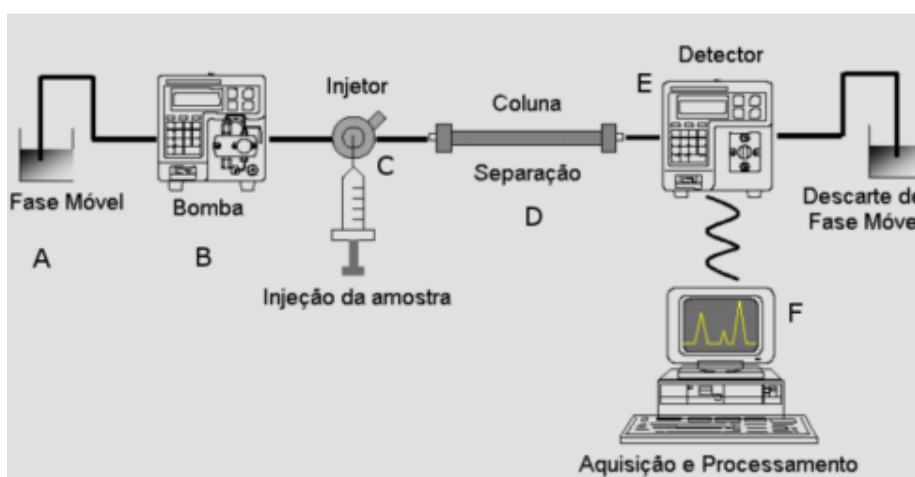


Figura 1: Componentes essenciais de um sistema de CLAE. A- reservatório da fase móvel; B- bomba de alta pressão; C – injetor da amostra; D - coluna cromatográfica; E - detector; F- computador (sistema de aquisição de dados) (Adaptada de BEDOR, 2007).

De uma maneira geral, o funcionamento de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência pode ser descrito da seguinte forma. A fase móvel, acondicionada no reservatório, é impulsionada por uma bomba de alta pressão em direção à coluna, local onde ocorre a separação dos diversos componentes da amostra logo após a sua injeção. Os compostos eluídos são direcionados para um detector, que por sua vez, envia sinais para o sistema de aquisição de dados. Com auxílio de um software apropriado, são gerados gráficos relacionando a resposta do detector com o tempo de análise (cromatogramas). Como mencionado acima, é na coluna cromatográfica que ocorre a separação entre os diversos compostos da amostra, o que a torna o componente essencial da CLAE.

A coluna cromatográfica consiste de um tubo cilíndrico preenchido com pequenas partículas esféricas, tendo usualmente de 1,5 a 5 μm de diâmetro. Essas partículas são, na maioria dos casos, compostas de sílica porosa. A superfície interna desses poros é coberta com a fase estacionária. Assim, os componentes da amostra difundem-se para dentro dos

poros das partículas e interagem com a fase estacionária, de forma que cada um deles seja seletivamente retido, resultando em migrações diferenciais desses componentes através da coluna (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

A Tabela 1 apresenta os diferentes modos de separação cromatográfica utilizados em CLAE. Esses modos são determinados pela escolha da fase móvel e fase estacionária

Tabela 1: Diferentes modos de CLAE (Adaptada de SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

Modo cromatográfico	Comentário
Cromatografia de fase reversa (RPC)	A fase estacionária é apolar (C18) e a fase móvel é uma mistura polar de água e um solvente orgânico (por exemplo, metanol, acetonitrila).
Cromatografia de fase reversa (NPC)	A fase estacionária é polar e a fase móvel é uma mistura de solventes pouco polares (por exemplo, hexano diclorometano).
Cromatografia de fase reversa não-aquosa (NARP)	A fase estacionária é apolar e a fase móvel é uma mistura de solventes orgânicos.
Cromatografia de interação hidrofílica (HILIC)	A fase estacionária é polar e a fase móvel é uma mistura de água e um solvente orgânico.
Cromatografia de troca iônica	A coluna contém grupos carregados que se ligam com os componentes de iônicos de carga oposta da amostra. A fase móvel é composta de uma solução salina aquosa e uma solução tampão.
Cromatografia de par iônico	São utilizadas as mesmas condições da RPC, porém um reagente de par iônico é adicionado na fase móvel.
Cromatografia exclusão por tamanho	Uma coluna inerte é utilizada com uma fase móvel composta de água ou solvente orgânico.

Apesar da maioria das aplicações da cromatografia líquida de alta eficiência ser realizada utilizando-se colunas de fase reversa, nesse estudo foi utilizado uma coluna de interação hidrofílica (HILIC), devido aos analitos serem moléculas polares de caráter básico, classe de substâncias na qual a HILIC oferece inúmeras vantagens. Sendo assim, será apresentada a seguir uma descrição mais detalhada da cromatografia de interação hidrofílica.

2.1.1 Cromatografia de interação hidrofílica

Nos últimos 20 anos, a cromatografia de fase reversa (RPC) tem sido a primeira escolha na análise de moléculas de interesse biológico e em muitos outros campos de aplicação em que se deseja realizar a análise de compostos de baixa ou média polaridade. Entretanto, a retenção de compostos polares nesse modo (RPC) geralmente requer uma grande quantidade de água na fase móvel para se obter alguma retenção dos analitos, o que ocasiona diversos problemas, tais como a diminuição da sensibilidade em CLAE-EM empregando a ionização por eletronebulização. Uma alternativa seria a utilização da cromatografia de troca-iônica e emparelhamento de íons, porém essas técnicas também apresentam limitações na análise de compostos polares. Ambas podem funcionar razoavelmente bem quando os analitos são ionizáveis. Porém, os reagentes empregados no emparelhamento de íons geralmente causam supressão de sinal em espectrometria de massas, diminuindo, assim, a sensibilidade do método (LANÇAS, 2010).

Portanto, existe um espaço não apropriadamente explorado para a análise de solutos polares, sendo a cromatografia, que envolve interação hidrofílica (HILIC), o modo atualmente mais apropriado para preencher tal lacuna (LANÇAS, 2010).

A HILIC é uma forma de cromatografia que utiliza uma fase estacionária polar (como por exemplo, a sílica pura) em conjunção com uma fase móvel contendo uma mistura de água (pelo menos 2,5%) e um solvente orgânico (tipicamente >70 % acetonitrila). Neste tipo de cromatografia, a água é o solvente como maior força de eluição. Assim, o aumento do teor de água na fase móvel, acarreta na diminuição dos tempos de retenção dos analitos — em oposição ao comportamento na RFC. Muitos compostos que apresentam pouca ou nenhuma retenção em RPC ($k \approx 0$) podem ser separados utilizando-se a HILIC (MCCALLEY, 2007; MCCALLEY, 2010; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

A HILIC apresenta também outras grandes vantagens, tais como (MCCALLEY, 2007):

- Melhoria do formato de picos para compostos básicos;
- Aumento da sensibilidade de métodos por CLAE-EM;
- Possibilidade de injeção direta de amostras dissolvidas primariamente em solventes orgânicos;
- Possibilidade de aumentar o fluxo da fase móvel, devido à sua baixa viscosidade.

Apesar da ordem de eluição dos compostos analisados através da cromatografia de fase normal ser inversa à cromatografia de fase reversa, na HILIC, a ordem de eluição dos compostos fica entre esses dois extremos. Essa observação reflete o fato de que a “polaridade” de um composto é uma função complexa da sua estrutura molecular e das interações entre o analito e a fase estacionária (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

A fase móvel típica empregada para separação de compostos não ionizáveis em HILIC consiste em uma solução contendo acetonitrila e uma pequena proporção de água. Nesses casos, não é necessário o uso de tampões. Para compostos ionizáveis, a escolha de um tampão adequado é difícil devido à baixa solubilidade dos tampões em fases móveis contendo altas proporções de solventes orgânicos. Aditivos iônicos, tais como formato e acetato de amônio, são bastante empregados para controlar o pH da fase móvel e a força iônica em HILIC. Além disso, esses tampões são voláteis o suficiente para serem compatíveis com seu uso no acoplamento CLAE-EM (LANÇAS, 2010).

Na análise de pequenas moléculas, a HILIC destaca-se na análise de compostos de caráter básico. A HILIC tem sido bastante empregada na análise de fármacos, pois mais de 70% deles são compostos básicos (MCCALLEY, 2010).

2.2 Espectrometria de massas

A ideia descrita por J. J. Thompson, no final do século 19, de separar íons com base na relação entre suas massas e cargas elétricas deu origem à espectrometria de massas. Desde então, esta técnica tem se desenvolvido cada vez mais. Ao longo das últimas décadas, a EM se tornou uma das ferramentas centrais da química analítica, envolvida em uma grande variedade de aplicações desde a física atômica, geocronologia à ciência forense. Mais recentemente, tem sido amplamente utilizada em proteômica, metabolômica e na quantificação de fármacos em matrizes biológicas (DE HOFFMANN, STROOBANT, 2007; EKMAN et al., 2009).

O espectrômetro de massas é composto de uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector. Na fonte de ionização é onde são formados os íons em estado gasoso, os quais são separados pelo analisador de massas, de acordo com a razão massa-carga (m/z), antes de serem finalmente detectados (MOBERG, 2006).

Várias técnicas de separação foram desenvolvidas visando à análise de íons com base nas suas razões m/z , o que deu origem aos diferentes tipos de analisadores de massas

encontrados atualmente no mercado. Além disso, existe uma variedade ainda maior de técnicas de ionização. A Figura 2 mostra de forma esquemática a composição de um espectrômetro de massas e as principais técnicas utilizadas na fonte de íons, analisadores de massas e detecção de compostos (MCMASTER, 2005; MORAES; LAGO, 2003).

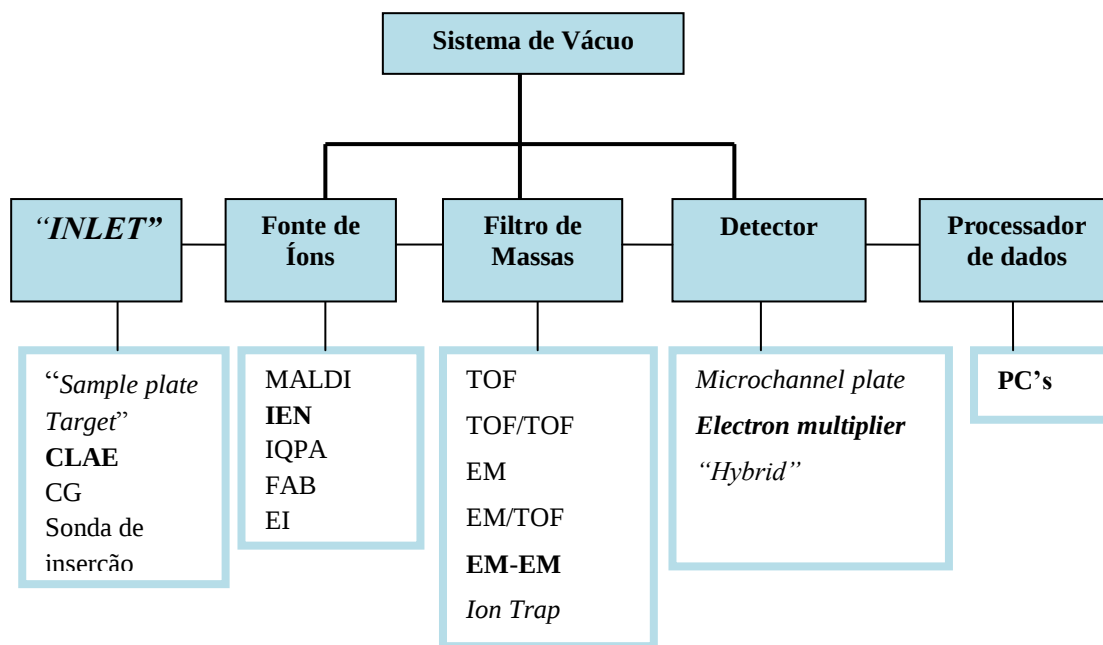


Figura 2: Componentes do espectrômetro de massas e suas diversas técnicas (Adaptado de BEDOR, 2007).

Para que seja possível a realização de uma análise por EM, é necessário que os analitos estejam ionizados e na fase gasosa, pois, só assim, poderão ser transferidos para o analisador de massas. Porém, como a espectrometria de massas é utilizada na análise de amostras sólidas, líquidas ou gasosas, e com aplicações voltadas desde a análise elementar à análise de composição de proteínas, fez-se necessário o desenvolvimento de várias técnicas de ionização (MORAES; LAGO, 2003).

A ionização dos compostos pode ser realizada à pressão atmosférica ou no vácuo. Essencialmente, existem três diferentes técnicas de ionização à pressão atmosférica (IPA), nominalmente, a ionização química à pressão atmosférica (IQPA) (HONEYWELL et al., 2007), a fotoionização à pressão atmosférica (FIPA) (RAFFAELLI; SABA, 2003) e a ionização por eletronebulização (IEN) (KEBARLE; TANG, 1993).

É importante ressaltar que o desenvolvimento das técnicas de ionização à pressão atmosférica possibilitou a união viável e efetiva da espectrometria de massas com a cromatografia líquida de alta eficiência (PEREIRA; BICALHO; LILLA, 2005). A Figura 3 mostra, de forma esquemática, as técnicas de ionização à pressão atmosférica mais adequadas dependendo do peso molecular e da polaridade dos analitos.

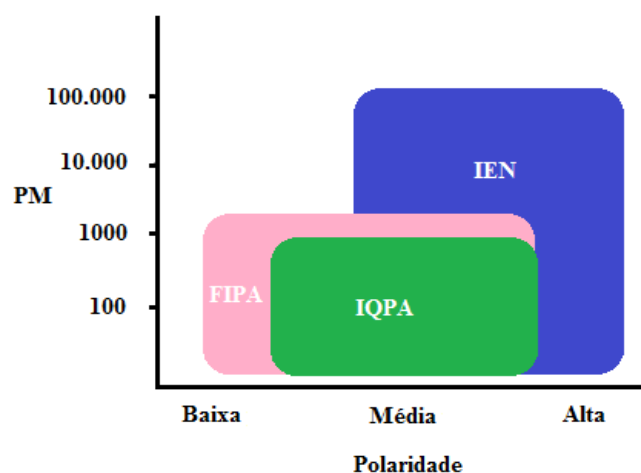


Figura 3: Esquema relacionando as técnicas de ionização à pressão atmosférica com o peso molecular e a polaridade dos compostos (Adaptada de PEREIRA; BICALHO; LILLA, 2005). IEN- Ionização por eletronebulização; IQPA – Ionização química à pressão atmosférica; fotoionização à pressão atmosférica.

Um espectrômetro de massas com fonte de ionização IEN e um analisador triplo-quadupolo foi utilizado neste trabalho. Em virtude disso, a seguir será apresentada uma descrição mais detalhada de ambas as técnicas.

2.2.1 Ionização por eletronebulização

A técnica de ionização por eletronebulização oferece a vantagem de poder ser aplicada na análise de uma ampla variedade de espécies, desde um simples eletrólito, tal como Na^+ , até macromoléculas, como proteínas (KEBARLE; TANG, 1993).

Essa técnica foi introduzida por Yamashi e Fenn em 1984, mas levou anos antes de ter sua importância reconhecida. Atualmente, é uma das técnicas de ionização mais aplicada na análise de biomoléculas (MORAES; LAGO, 2003).

A Figura 4 apresenta, esquematicamente, os componentes de uma fonte de ionização que utilizando a técnica IEN.

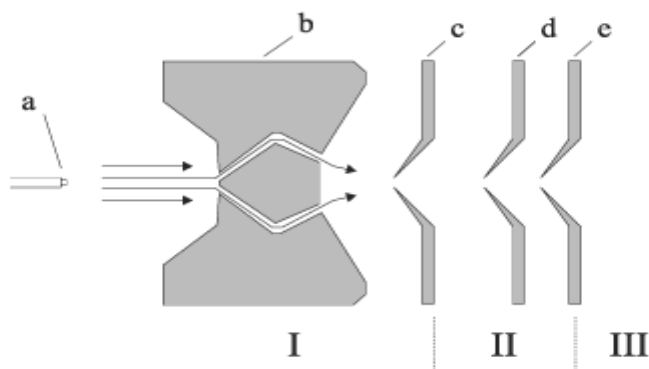


Figura 4: Representação esquemática de uma fonte de ionização por eletronebulização: a-capilar; b-contra-eletródo; c-cone de amostragem, d-skimmer, e-lentes do skimmer. A região I está à pressão atmosférica, a região II, a pressão intermediária e a região III, sob alto vácuo. (Adaptada de MORAES; LAGO, 2003).

O mecanismo da IEN pode ser entendido da seguinte forma. Uma alta voltagem (2-5 kV) é aplicada no capilar metálico presente na fonte de ionização. Esse capilar geralmente está localizado a uma distância de 1 a 3 centímetros do contra- eletródo. Esse, por sua vez, tem um orifício que leva os íons ao analisador de massas. Devido à ponta do capilar ser bastante estreita, o campo elétrico (E) nesta região é muito intenso ($E \cong 10^6$ V/m), o que causa a movimentação dos eletrólitos dissolvidos no líquido. Se, por exemplo, o capilar estiver carregado positivamente, os íons de mesma carga tendem a se movimentam em direção à superfície do líquido voltada para o contra-eletródo. O acúmulo de íons positivamente carregados na ponta do capilar leva a desestabilização da superfície do líquido, que assume uma forma peculiar, semelhante a um cone, chamada de cone de Taylor. Quando o campo elétrico atinge um valor suficientemente elevado, os íons “vencem” a tensão superficial e um fino filamento do líquido é emitido através do capilar. A uma determinada distância, esses filamentos se tornam instáveis e formam pequenas gotículas carregadas. Com o auxílio de gases nebulizantes e secantes, o solvente é gradualmente evaporado, causando a diminuição do volume das gotículas e o aumento da densidade de cargas elétricas, provocando o colapso da gota. A partir das inúmeras fissões, alguns íons são dessolvatados. Assim, são gerados os íons em estado gasoso (Figura 5) (KEBARLE; TANG, 1993).

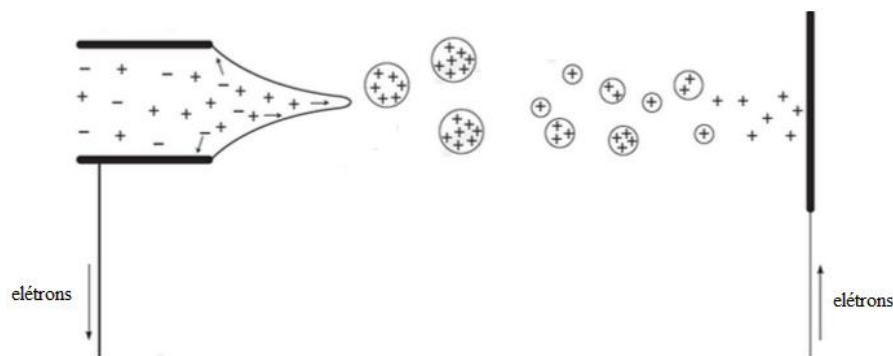


Figura 5: Representação do mecanismo da técnica de ionização por eletronebulização (adaptada de KEBARLE; TANG, 1993).

2.2.2. Triplo-quadropolo

Fisicamente, um quadropolo é constituído de quatro hastes paralelas, de forma que os pares opostos são submetidos a um potencial elétrico fixo (DC) e um potencial de radiofrequência (RF), como mostrado na Figura 6. O feixe de íons é então focalizado no eixo central destas hastes. Para uma dada combinação de RF e DC, íons com uma determinada razão m/z assumem uma trajetória estável e atravessam o quadropolo. Enquanto isso, os outros íons, com diferentes razões m/z , colidem com as hastes, devido às suas trajetórias instáveis. Assim, o quadropolo atua como um “filtro de íons” (BEDOR, 2007).

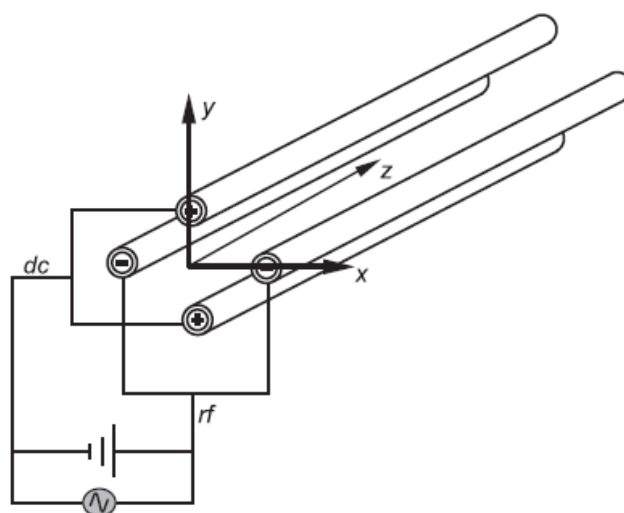


Figura 6: Esquema de um analisador quadropolar (Adaptado de CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008)

Um quadrupolo pode operar basicamente de duas maneiras. No modo SIM (*selected ion monitoring*) uma combinação fixa de voltagens DC e RF é aplicada ao quadrupolo, de forma que apenas um (ou um número reduzido) de íons são transmitidos pelo quadrupolo. No modo SCAN, é feita uma varredura da voltagem DC, permitindo que íons com diferentes valores de razão m/z sejam transmitidos sequencialmente pelo quadrupolo (BEDOR, 2007).

Um triplo quadrupolo é um analisador de massas composto por três quadrupolos dispostos em série. Apenas o primeiro (Q1) e terceiro quadrupolo (Q3) atuam como “filtro de íons”; enquanto que o segundo (Q2) é utilizado como câmara de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no Q1. Essa fragmentação ocorre devido à colisão do íon precursor proveniente do Q1 com moléculas de um gás inerte (geralmente Ar, He ou N₂) presentes na cela de colisão (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Em bioanálise, é muito comum utilizar o triplo quadrupolo configurado da seguinte forma: Q1 e Q3 operam no modo “SIM”, enquanto que Q2 opera com o gás de colisão ligado. Este tipo de modo de operação é denominado SRM (Single Reaction Monitoring) (Figura 7).

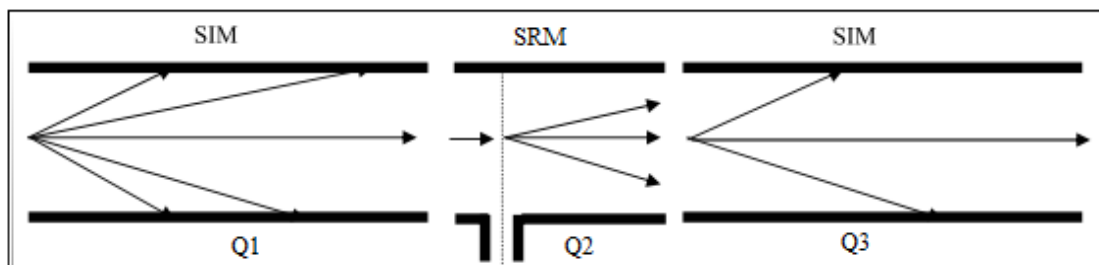


Figura 7: Modo de operação SRM (Adaptado de BEDOR, 2007).

2.3 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

O espectrômetro de massas atua como um detector altamente seletivo e, por isso, poderia se esperar que através de uma infusão direta da amostra sem algum tratamento prévio pudesse ser suficiente para identificar e quantificar os componentes da amostra. Mas, na medida em que a complexidade da amostra aumenta, é necessário realizar algumas etapas adicionais, tal como uma etapa de separação prévia a detecção, pois composição da matriz pode afetar a intensidade do íon monitorado, diminuindo ou aumentando o seu sinal. Isso ocorre devido à interferência de outros íons presentes na fonte de ionização (MOBERG; BERGQUIST; BYLUND, 2006).

2.3.1 Desenvolvimento de métodos por cromatografia líquida e alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série

A obtenção de baixos limites de quantificação e uma alta precisão são características desejadas na maioria dos métodos por CL-EM. De forma a alcançar esses requerimentos, algumas precauções tem de ter tomadas durante o processo de desenvolvimento do método. O conhecimento dos princípios da técnica é crucial, e esse entendimento tem que ser traduzido na seleção das condições experimentais corretas (MOBERG, 2006).

Existem inúmeros parâmetros que afetam o sistema CLAE-EM. Assim, durante o desenvolvimento de métodos por CLAE-EM/EM, existem três diferentes regiões a serem consideradas: 1) O sistema de CLAE; 2) A fonte de ionização; e 3) o espectrômetro de massas (EM-EM).

2.3.1.1 Fatores do sistema de CLAE

O tipo e dimensão da coluna cromatográfica, a composição e o fluxo da fase móvel, temperatura são parâmetros que afetam diretamente na seletividade e retenção dos analitos. Especificamente, em eluições isocráticas realizadas à temperatura ambiente, a seletividade da fase móvel é determinada majoritariamente pela composição da fase móvel. No caso dos analitos serem ionizáveis, o pH e a força iônica do meio também exercem grande influencia sobre essas respostas. A seleção do tampão deve ser feita de modo a assegurar a sua capacidade tamponante, assim, um tampão que tenha um valor de pKa próximo ao pH desejado deve ser selecionado. No caso da fonte de ionização IEN, é importante a utilização de tampões voláteis (MOBERG, 2006).

Os tampões comumente utilizados no sistema CLAE-IEN-EM são o acetato de amônio, bicarbonato de amônio, formato de amônio e ácido trifluoracético. Geralmente na CLAE, as concentrações desses tampões variam de 10 a 50mmol/L. Entretanto, em análises por CLAE-EM, uma concentração alta de tampão poderá causar a supressão iônica do analito, assim, são utilizadas concentrações de no máximo 20 mmol/L.(MCMMASTER, 2005).

2.3.1.2 Fatores da fonte de ionização por eletronebulização

O processo de ionização é afetado por inúmeros parâmetros tais como a composição e fluxo da fase móvel, voltagem do capilar, temperatura da fonte de ionização, pressão do gás nebulizador, pressão do gás secante, etc. Devido a isso, a determinação das condições ótimas de trabalho não é uma tarefa fácil (MORBERG, 2006).

2.3.1.3 Fatores da espectrometria de massas (EM/EM)

A diferença de potencial entre o capilar e o contra-eletrodo, denominada *declustering potencial* (DP), afeta diretamente o número de agregados iônicos (“clusters”) constituídos por íons dos analitos em conjunto com os do solvente. A formação dessas partículas carregadas causa a diminuição da sensibilidade do analito. Ao aumentar o valor de DP, ocorre a diminuição de formação desses agregados. Porém, se o valor de DP for muito elevado, os íons do analito poderão ser fragmentados ainda na fonte, devido à colisão destes com as moléculas do gás. Outros parâmetros do espectrômetro de massas exercem uma importante influência na sensibilidade do método, tais como a energia de colisão e a pressão do gás de colisão.

A partir das informações descritas acima, fica evidente que encontrar as condições ótimas de operação para um sistema de CLAE-EM/EM não é um processo fácil. Devido a isso, a utilização de técnicas estatísticas, tais como o planejamento de experimentos, como meios para auxiliar no desenvolvimento de métodos têm se tornado cada vez mais frequente.

2.4 Planejamento de experimentos e metodologia de superfície de resposta

De uma forma geral, experimentos são realizados com o propósito de conhecer melhor algum sistema no qual ocorre algum processo. Pode-se considerar um sistema como um modelo que envolve uma combinação de fatores (ex., temperatura, pressão) que influenciam algum processo (ex., uma reação química) e geram alguma resposta (ex., rendimento da reação). Esses fatores podem ser controlados ou não (ainda que possam ser monitorados), como representado na Figura 8 (MONTGOMERY, 2001).

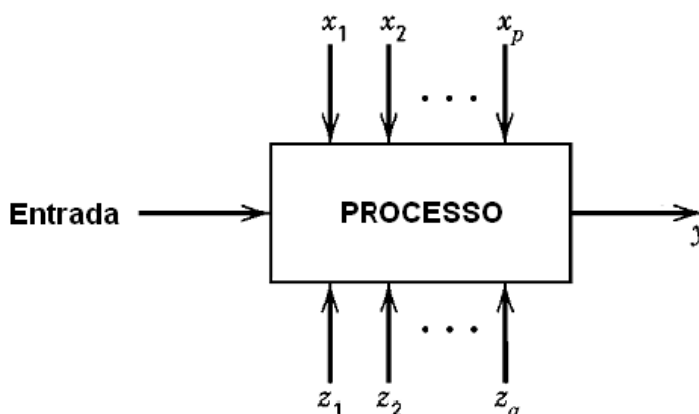


Figura 8: Esquema geral de um processo em um sistema. As variáveis controláveis estão representadas por “x”, as variáveis não controláveis por “z” e a resposta por “y”. (Adaptada MONTGOMERY, 2001).

Geralmente, um pesquisador, ao estudar algum sistema, está interessado em responder algumas das seguintes questões: 1) Que fatores exercem influencia sobre as respostas investigadas? 2) Como proceder para otimizar essas respostas? 3) Que fatores devem ser controlados para assegurar o controle das respostas? (NETO,SCARMINIO,BRUNS, 2010).

Para isso, existem várias estratégias de experimentação. A forma mais simples é baseando-se na experiência prévia do analista sobre o sistema em estudo, a partir da qual certas condições são definidas e o experimento é conduzido (*Best-guess approach*). O problema desta estratégia é que ela se baseia na "tentativa e erro" e que não se tem garantia de que a condição eleita é realmente a melhor. Outra estratégia usualmente utilizada é a variação de um fator por vez (*one-factor-at-a-time*, OFAT). Esse procedimento consiste em selecionar um ponto inicial de níveis para os fatores e então variar sucessivamente cada fator mantendo-se os demais no nível inicial. A grande desvantagem deste método é desconsiderar os efeitos causados pelas interações entre os fatores, acarretando em perda de informações relevantes (MENECHINI, 2011;MONTGOMERY, 2001).

A estatística nos oferece um conjunto de ferramentas que possibilitam extrair do sistema em estudo o máximo de informações úteis de uma forma mais racional, econômica e com um número mínimo de experimentos (NETO,SCARMINIO,BRUNS, 2010). Dentre essas conjunto de técnicas estatísticas estão o planejamento de experimentos (*Design of experiments*, DOE) e a metodologia de superfície de resposta (*Response surface methodology*, RSM) .

É importante ressaltar que o conhecimento técnico que o especialista já detém sobre o sistema em estudo nunca deve ser menosprezado, pois as ferramentas estatísticas, embora valiosas, são apenas um complemento a esse conhecimento (NETO,SCARMINIO,BRUNS, 2010).

Os planejamentos experimentais podem ser divididos em três grupos, dependendo dos objetivos do pesquisador (MENECHINI, 2011):

- a) Planejamentos de triagem: Tem como objetivo determinar, dentre um grande número de fatores, quais deles exercem influencia sobre a resposta. Alguns exemplos de experimentos desse tipo são: planejamento fatorial fracionário, planejamento de *Plackett-Burman*.
- b) Planejamentos de otimização: Esses planejamentos envolvem poucos fatores e têm, em última instância, o desenvolvimento de modelos e a determinação das condições

ótimas para o processo. Alguns exemplos são os planejamentos compostos centrais e o planejamento de Box-Behnken.

- c) Qualidade global do processo: Esses planejamentos visam a avaliação da perturbação da qualidade (ou da resposta) causadas por pequenas variações dos níveis dos fatores. Alguns exemplos são a metodologia de Taguchi e Youden-Steine.

A condução de experimentos bem planejados permite o desenvolvimento de modelos matemáticos relacionando a resposta investigada com os fatores que a afetam. Em termos formais, podemos dizer que o pesquisador está interessado em estudar a seguinte relação funcional (BOX; DRAPER, 2007):

$$\eta = f(x_1, x_2, \dots, x_k) \quad (1)$$

Essa equação expressa a resposta, η , em função dos fatores investigados. A superfície pertencente ao espaço $(k+1)$ -dimensional obtida por esta função é denominada superfície de resposta (BOX; DRAPER, 2007).

A operação do sistema com k fatores em determinados níveis $x_1, x_2, \dots, x_k$ é referida como uma corrida experimental. Se a mesma corrida for realizada várias vezes, sob as mesmas condições, a resposta irá variar devido aos erros experimentais. Assim, η é referida como a média da resposta de uma condição experimental em particular $(x_1, x_2, \dots, x_k)$. A resposta efetivamente observada, y , recaí em alguma distribuição estatística em torno da média η . A discrepância $y - \eta$ entre o valor observado e o valor médio η é chamado de erro e é denotado por ε . Ou seja, de forma geral, o objetivo de uma investigação é estudar certos aspectos da relação funcional afetada por um erro experimental, isto é, $y = f(x) + \varepsilon$ (BOX; DRAPER, 2007).

Em muitos problemas (ou na maioria deles) a verdadeira forma de relacionamento entre a resposta e os fatores é desconhecida, então, se torna necessário encontrar uma aproximação adequada para $f(x_1, x_2, \dots, x_k)$. Usualmente, essa aproximação é feita através do emprego de uma função polinomial de baixo grau em uma determinada região R definida. Os modelos obtidos assim são denominados modelos empíricos, isto é, modelos que procuram apenas descrever, com base na evidência experimental, o comportamento do processo estudado. Em outras palavras, na modelagem empírica, tentamos descrever o processo estudado na região experimental investigada, por isso, eles são ditos modelos locais (BOX; DRAPER, 2007; NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2010).

Os modelos de superfície de resposta que são usualmente ajustados incluem o modelo de primeira ordem, o modelo de primeira ordem com interações entre dois fatores e o modelo de segunda ordem, como mostrado abaixo nas Equações 2-4, onde, k é o número de variáveis; b_o é a estimativa do termo constante; b_i representa as estimativas dos coeficientes dos parâmetros lineares; b_{ii} representa as estimativas dos coeficientes dos termos quadráticos, b_{ij} representa as estimativas dos coeficientes das interações entre os parâmetros; x_i representa as variáveis; e, por fim, e representa a estimativa do erro experimental. Na maioria das vezes, estes modelos são ajustados através de uma regressão linear (simples ou múltipla).

$$y = b_o + \sum_{i=1}^k b_i x_i + e \quad (2)$$

$$y = b_o + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{1 \leq i \leq j}^k b_{ij} x_i x_j + e \quad (3)$$

$$y = b_o + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i \leq j}^k b_{ij} x_i x_j + e \quad (4)$$

2.4.1 Regressão Linear Múltipla

O procedimento de estabelecer uma relação matemática linear (ou talvez quadrática) entre a resposta, por exemplo, a área de um pico cromatográfico, e a concentração de composto de interesse é familiar para os químicos analíticos. A filosofia por trás desse procedimento pode ser expandida de um contexto univariado para o multivariado. Com a MLR, uma relação linear é estabelecida entre as variáveis independentes (X) e a resposta (Y): $Y=XB + E$, onde Y é a matriz das respostas, B é a matriz das estimativas dos coeficientes de regressão e E é a matriz dos erros experimentais. A matriz X contém os fatores em níveis codificados e termos adicionais de interesse, por exemplo, termos quadráticos. Os coeficientes de regressão são estimados pela Equação 5 (MOBERG, 2006):

$$B = (X^T X)^{-1} X^T Y \quad (5)$$

2.4.2 Planejamento experimental para ajuste de um modelo de primeira ordem

O tipo de planejamento mais utilizado para construção de modelos de primeira ordem são os planejamentos fatoriais.

Em um planejamento fatorial são investigadas as influências de todas as variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação sobre a resposta. Se a combinação de k fatores é investigada em dois níveis, um planejamento fatorial consistirá de 2^k experimentos. Normalmente, os níveis dos fatores quantitativos (i.e. concentrações de uma substância, valores de pH, etc.) são nomeados pelos sinais – (menos) para o nível mais baixo e + (mais) para o nível mais alto, porém o que importa é a relação inicial entre o sinal dado e o efeito obtido, não sendo um critério definido a nomeação dos sinais. Para fatores qualitativos (i.e. tipos de ácidos, tipo de catalisadores, etc.), como não existem valores altos ou baixos, fica a critério do pesquisador nomear os seus níveis (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Os sinais para os efeitos de interação de segunda ordem e de ordem superior entre todas as variáveis do planejamento, realizando todas as combinações possíveis, são obtidos pelo produto dos sinais originais das variáveis envolvidas. Desta maneira, é possível construir as colunas de sinais para todas as interações e, assim, elaborar a matriz de coeficientes de contraste (Figura 9) (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Média	Variáveis			Interações			
	x_1	x_2	x_3	x_{12}	x_{13}	x_{23}	x_{123}
+	-	-	-	+	+	+	-
+	+	-	-	-	-	+	+
+	-	+	-	-	+	-	+
+	+	+	-	+	-	-	-
+	-	-	+	+	-	-	+
+	+	-	+	-	+	-	-
+	-	+	+	-	-	+	-
+	+	+	+	+	+	+	+

Figura 9: Matriz de coeficientes de contraste para um planejamento fatorial 2^3 (Adaptada de TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Uma coluna de sinais + é adicionada à esquerda da matriz de coeficientes de contraste para o cálculo da média de todas as respostas observadas.

Supondo-se que um planejamento fatorial com n ensaios e y_i observações individuais foi realizado, os efeitos para cada coluna da matriz de coeficiente de contrastes são calculados pelas seguintes Equações (TEÓFILO; FERREIRA, 2006):

$$ef_{médio} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n} \quad (6)$$

$$ef = \frac{\sum_{i=1}^{n/2} y_{i(+)}}{n/2} - \frac{\sum_{i=1}^{n/2} y_{i(-)}}{n/2} \quad (7)$$

A Equação 6 descreve o efeito para média do total as observações, enquanto que a Equação 7 descreve o cálculo do efeito para as variáveis e interações usando a diferença entre as médias das observações no nível mais (+) e as médias das observações no nível menos (-).

2.4.3 Planejamento experimental para ajuste de um modelo de segunda ordem

Um planejamento experimental para ajustar um modelo de segunda ordem deve ter pelo menos três níveis para cada fator para que os parâmetros do modelo possam ser estimados.

O planejamento mais amplamente usado para ajustar um modelo de segunda ordem é o planejamento de composição central. Em geral, um planejamento composto central para k fatores, devidamente codificados como $(x_1, x_2, \dots, x_k)$ é formado de três partes (NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2010):

- 1- Uma parte chamada fatorial (ou cúbica), cotendo um total de n_{fat} pontos de coordenadas $x_i = -1$ ou $x_i = +1$, para todos os $i = 1, \dots, k$;
- 2- Uma parte axial (ou em estrela), formada por $n_{ax} = 2k$ pontos com todas as coordenadas nulas, exceto uma, que é igual a um certo α ;
- 3- Um total de n_{centr} ensaios realizados no ponto central.

Para realizar um planejamento composto central é preciso decidir quantos e quais serão os pontos cúbicos, qual o valor de α e quantas repetições serão realizadas no ponto central. O valor de α costuma ficar entre 1 e $\sqrt{k}$. Quando $\alpha = \sqrt{k}$, os pontos cúbicos e os pontos axiais ficam sobre uma superfície de uma (hiper)esfera e o planejamento é chamado esférico. Caso o valor de α seja igual a 1, os pontos axiais se localizam nos centros das faces de um (hiper)cubo, definido pela parte cúbica do planejamento (NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2010). Dois exemplos desse tipo de planejamento estão mostrados na Figura 10.

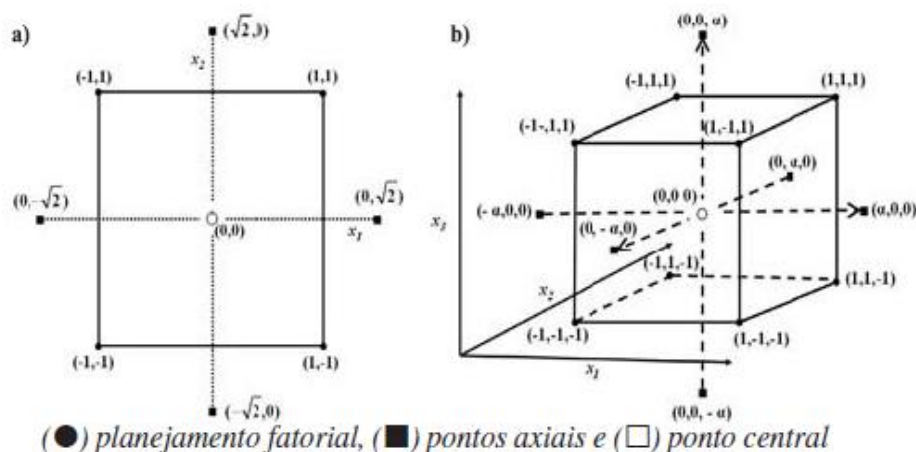


Figura 10: Exemplos de planejamentos compostos centrais: (a) $k=2$ e $\alpha=1,414$; (b) $k=3$ e $\alpha=1,682$. (Adaptada de TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

2.5 Métodos de extração e *clean-up* de amostras

A análise cromatográfica de substâncias presentes em matrizes biológicas (soro, plasma, urina, saliva e fluido cérebro espinhal), em geral, requer um pré-tratamento da amostra. As razões para isso são inúmeras, destacando-se a complexidade das matrizes biológicas, das quais os compostos são obtidos, a existência de proteínas que são incompatíveis com as colunas cromatográficas (HUBERT et al., 1999) e a concentração das substâncias a serem analisadas. As técnicas de extração e/ou pré-concentração permitem que a análise dos componentes de interesse se torne possível. A meta final é a obtenção de uma subfração da amostra original enriquecida com as substâncias de interesse analítico, de forma que se obtenha uma separação cromatográfica livre de interferentes (*clean up*), com detecção adequada (altas recuperações) e um tempo razoável de análise. A presença de interferentes que compõem a matriz plasmática é um dos fatores que fazem com que métodos bioanalíticos com a utilização de técnicas de CLAE-UV tenham tempos de análise longos por amostra para que haja separação cromatográfica entre os picos de interferentes, analito e padrão interno. Na técnica de CL-EM/EM, a consequência da presença de interferentes é a supressão iônica causada pela co-eluição dos interferentes com o analito provocando uma competição entre analitos e interferentes na fonte de íons no momento da ionização das moléculas, diminuindo a sensibilidade do método (BEDOR, 2007; ORLANDO et al., 2009).

Em virtude do alto vácuo e dos componentes sensíveis do espectrômetro de massas, componentes indesejados provenientes das amostras podem contaminar e, até mesmo, danificar o equipamento. Como consequência, é imprescindível realizar um pré-tratamento das amostras antes de analisá-las. O processo de preparação das amostras pode realizado de

diversas maneiras, dependendo das características dos compostos de interesse e da natureza da amostra (MOBERG, 2006).

A escolha do tipo de tratamento empregado é feita em função das características da matriz (em estudos de farmacocinética comparada a matriz mais comumente utilizada é o plasma), do analito e das condições de análise empregadas que incluem, principalmente, o tipo de técnica e de instrumentação disponíveis no local de trabalho. Dessa forma, o conhecimento dessas matrizes e da farmacocinética do princípio ativo ordena o desenvolvimento das técnicas de extração e detecção utilizadas para assegurar especificidade/seletividade para a determinação do limite de quantificação e da faixa linear (BEDOR, 2007; ORLANDO et al., 2009). As técnicas mais comumente utilizadas para extração e/ou pré-concentração de compostos presentes em fluidos biológicos são: extração líquido-líquido, extração em fase sólida, extração com fluido supercrítico e extração com membranas sólidas (diálise e ultrafiltração) ou líquidas (QUEIROZ et al., 2001).

2.5.1 Extração Líquido-Líquido

A ELL é feita pela adição e agitação de um solvente imiscível na matriz e a extração acontece pela passagem do analito para o solvente imiscível (QUEIROZ et al., 2001). Após a agitação são formadas duas fases líquidas que são, então, separadas. A fase contendo o analito pode ser evaporada, no caso de solventes orgânicos, ou pode ser, quando aquosa, analisada diretamente no sistema cromatográfico (SNYDER et al., 1997).

A ELL é um processo baseado no equilíbrio com o analito se distribuindo entre duas fases imiscíveis sendo que a quantidade total extraída está relacionada com o coeficiente de partição entre essas duas fases. Dessa forma, pelo menos em teoria não é possível esperar extrações com recuperação de 100% (ORLANDO et al., 2009).

A eficiência da ELL vai depender de alguns fatores como pH, pKa, solubilidade, complexação e concentração salina, que devem ser ajustadas para aumentar a solubilidade do analito na fase extratora, elevando o coeficiente de partição (SNYDER et al., 1997). Reações de derivação também são utilizadas para aumentar a solubilidade do analito na fase extratora.

O pKa da molécula em estudo tem extrema relevância quando se trata de fármacos ionizáveis pois a partição entre as fases depende do estado em que o composto se encontra levando-se em consideração o pKa e o pH do meio, conforme a Equação 8.

$$pH = pKa - \frac{\log[H^+]}{\log[A^-]} \quad (8)$$

Para a obtenção de um método eficiente, com “clean-up” e recuperação adequada, o analito deve encontrar-se na forma não-ionizada para ocorrer uma partição entre as fases com uma maior concentração na fase orgânica. No caso de amostras onde existem agentes complexantes na matriz, a extração pode ficar prejudicada se o analito estiver altamente ligado a este agente. Neste caso, podem ser utilizados detergentes, ácidos ou bases fortes ou outras substâncias que gerem a lise do complexo (ORLANDO et al., 2009). As principais vantagens da ELL são as facilidades de operação manual, o relativo baixo custo e a boa aplicabilidade em amplo espectro de composto, com extratos limpos, boa recuperação e boa reprodutibilidade. Já os principais problemas apresentados devem-se à produção de resíduos orgânicos, a formação de emulsões durante a extração, as dificuldades de automação, além de não se apresentar adequada para a extração de compostos altamente polares. Ademais, há necessidade de evaporação de volumes consideráveis de solventes que introduzem vapores orgânicos no ambiente, a difícil automação e os baixos níveis de repetibilidade / reprodutibilidade das análises (BEDOR, 2005; ORLANDO et al., 2009).

As estratégias de extração de fármacos dependem da natureza da matriz biológica e das propriedades físico-químicas do analito em particular. Na extração líquido-líquido, o uso de procedimentos de múltiplas etapas envolvendo extração e re-extração em fase orgânica e aquosa com o controle apropriado do pH e da concentração iônica, podem extrair um analito seletivamente da matriz biológica, bem como reduzir a quantidade de interferentes e contaminantes no extrato final (SNYDER, 1997).

2.6 Olanzapina

A olanzapina (OLZ) é um fármaco antipsicótico, da classe dos tienobenzodiazepínicos, que possui ação no sistema nervoso central, ocasionando melhoras dos sintomas em pacientes com esquizofrenia, episódios depressivos associados a distúrbio bipolar, episódios agudos de mania, transtorno de personalidade limítrofe, tratamento de manutenção em distúrbio bipolar e minoração das manifestações da síndrome de Gilles de la Tourette (MOURA, 2009). Atualmente, é anti psicótico mais prescrito no Brasil e um dos

mais prescritos no mundo (VAN DER ZWAAL et al., 2010). Junto a outros três fármacos, a quetiapina, aripiprazol e risperidona são responsáveis pela movimentação de cerca de 19 bilhões de dólares em vendas por ano, no mundo (FRAGA et al., 2010).

Foi obtido em 1982, pela empresa inglesa Eli Lilly a partir da clozapina e na década de 90 começou a ser comercializada na Europa e Estados Unidos, devido a apresentar um tratamento mais segura que a clozapina (RÊGO et al., 2010). No Brasil, passou a ser distribuído pelo Ministério da Saúde apenas em 1999, fazendo parte dos medicamentos excepcionais do Ministério da Saúde e em 2009 entrou no Componente especializado de Assistência Farmacêutica (BRASIL, 2009). No mesmo ano, foi firmada uma parceria para desenvolvimento produtivo entre o Ministério da Saúde e dois laboratórios farmacêuticos: o LAFEPE (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes) e a Cristália (Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA), para produção de alguns medicamentos, entre eles, a olanzapina, visando avanço tecnológico e desenvolvimento de medicamentos no país (BRASIL, 2008).

No mercado, é disponibilizada na forma farmacêutica de comprimidos revestidos em concentrações de 2,5, 5 e 10 mg como Zyprexa[®], na forma de comprimidos orodispersíveis em concentrações de 5 e 10 mg como Zyprexa Zidis[®] e ainda na forma de pó para injetáveis como o Zyprexa IM[®], sendo fabricados pela empresa Eli Lilly, cuja patente foi expirada em 2011 (BRASIL, 2014).

OLZ (Figura 11) possui fórmula molecular $C_{17}H_{20}N_4S$ e peso molecular de 312,43 g/mol. Sua nomenclatura química é 2-metil-4-(4-metil-1-piperazinil)-10H-tieno[2,3-b][1,5]benzodiazepina e apresenta-se como um sólido cristalino amarelo. Pertence à categoria de classe II do sistema de classificação biofarmacêutica (SCB), sendo altamente permeável através das membranas biológicas, mas possui baixa solubilidade em água (0,0343 mg/mL - 37°C) (DIXIT et al., 2011). Entretanto, é solúvel em n-propanol, moderadamente solúvel em acetonitrila e metanol e altamente solúvel em diclorometano (USP, 2012). Seu ponto de fusão é de 195°C e possui as seguintes constantes de dissociação: $pK_{a1} = 4,01$; $pK_{a2} = 7,24$; $pK_{a3} = 14,17$ (PubChem). O coeficiente de partição octanol/água (log P) da olanzapina é 3 (PubChem).

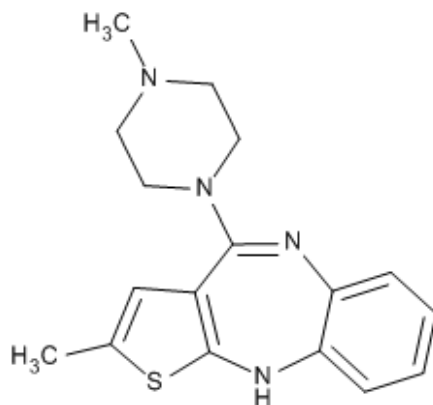


Figura 11: Estrutura química da olanzapina (obtida do Marvin®).

2.7 Quetiapina

A quetiapina (QTP) é um fármaco antipsicótico atípico, pertencente à classe dos derivados dibenzodiazepínicos, que possui ação no sistema nervoso central, sendo utilizada no tratamento de esquizofrenia ou episódios de mania associada à desordem bipolar (SMALL et al., 1997). Possui uma baixa incidência de efeitos secundários extrapiramidais e discinesia tardia quando comparado com antipsicóticos de primeira geração. A QTP interage com uma vasta gama de neurotransmissores, incluindo os dopaminérgicos (D1 e D2), os serotoninérgicos (5HT1A e 5HT2A), os histamínicos (H1) (pode-se explicar a sonolência observada) e os adrenérgicos ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) (pode-se explicar a hipotensão ortostática observado com este fármaco) (BARRETT et al., 2007; PAN et al., 2012; FDA, 2015).

O Seroquel (Fumarato de quetiapina) foi desenvolvido pela *AstraZeneca Pharmaceuticals* e aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), órgão regulador americano, em 1997. Atualmente, é comercializado em mais de 70 países para o tratamento da psicose associada à esquizofrenia (PAN et al., 2012).

No mercado, o seroquel é disponibilizado na forma farmacêutica de comprimidos em sete concentrações de 25, 50, 100, 200, 300 e 400 mg de quetiapina na forma de fumarato de quetiapina como ingrediente ativo para administração oral. É administrado numa dose inicial de 25 mg duas vezes por dia e ajustada, de acordo com a resposta clínica e tolerabilidade, dentro do alcance efetivo de 150-750 mg/dia (GUNASEKARA; SPENCER 1998).

Em 2009, a *AstraZeneca* submeteu, nos Estados Unidos, Canadá e União Europeia um novo pedido de registro para quetiapina numa forma farmacêutica de liberação sustentada para o tratamento da esquizofrenia. *AstraZeneca* vai manter o direito exclusivo de

comercializar quetiapina de liberação prolongada até 2017. A quetiapina de liberação prolongada é comercializado principalmente como Seroquel XR. Outros nomes de marketing são Seroquel Prolong e Seroquel Depot.

QTP (Figura 12) possui fórmula molecular $C_{21}H_{25}N_3O_2S$ e peso molecular de 383,5 g/mol. Sua nomenclatura química é 2-[2-(4-dibenzo [b,f] [1,4]tiazepin-11-il-1-piperazinil)etoxi]-etanol e apresenta-se como um sólido cristalino branco. Pertence à categoria de classe II do sistema de classificação biofarmacêutica (SCB), sendo altamente permeável através das membranas biológicas (Koziolek et al., 2013). A sua solubilidade diminui à medida que o pH aumenta, 4,23 a 0,055 g/100mL (pH de 1,03 a 12,02) (VOLGYI et al., 2010). Entretanto, é solúvel em HCl 0,1N, moderadamente solúvel em éter e em água (USP, 2012). Sua faixa de fusão é de 172 - 173°C e possui as seguintes constantes de dissociação: $pK_{a1} = 3,56$ e $pK_{a2} = 6,83$ (VOLGYI et al., 2010). O coeficiente de partição octanol/água ($\log P$) da quetiapina é 2.1 (FRENCH et al., 2011).

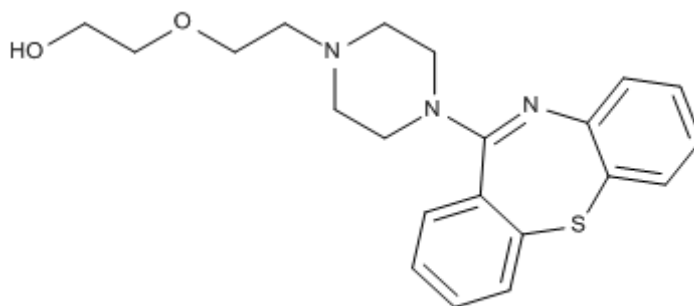


Figura 12: Estrutura química da quetiapina (obtida do Marvin®).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Elaborar uma estratégia sistemática de desenvolvimento de método bioanalíticos CLAE-EM/EM, com auxílio de técnicas estatísticas multivariadas, tais como o planejamento de experimentos e superfície de resposta;

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um método bioanalítico, aplicando a estratégia proposta, de modo a obter a separação cromatográfica de todos os compostos envolvidos na análise, utilizando a olanzapina e quetiapina como pior caso;
- Realizar a comparação, em termos de sensibilidade, entre o método de otimização univariado tradicional e o multivariado, desenvolvido com base nas técnicas estatísticas já citadas;
- Desenvolver um método de extração eficiente para ser aplicado no pré-tratamento das amostras.

METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais

Foram utilizados os padrões de olanzapina padrão USP (Lote: G0L368), quetiapina Padrão USP (Lote: F006X0) e cloridrato de venlafaxina (G0M315), assim como os solventes grau HPLC acetonitrila, 2-propanol (J.T. Baker), clorofórmio (J.T. Baker), diclorometano (J.T. Baker), MTBE (J.T. Baker) e os reagentes ácido fórmico 88% (J.T. Baker), ácido acético glacial (J.T. Baker), hidróxido de amônio 28-30% (Neon), hidróxido de sódio P.A. (Cinética), fosfato de sódio monobásico (J.T. Baker). A água ultrapura foi coletada através de um sistema de purificação Purelab Ultra (Elga).

4.2 Equipamentos

No preparo das soluções e amostras foram utilizados os seguintes equipamentos: vortex (Phoenix AP59), banho de ultra-som (Branson 2510), centrífuga refrigerada (Eppendor 5417R), secador de amostras dri-block® (Techne DB03), ultra-freezer (Sanyo MDF-U53VC), mesa agitadora (Finemixer SH 2000).

Todos os resultados aqui reportados foram realizados utilizando-se um cromatógrafo contendo duas bombas LC-20AD prominence (Shimadzu, Japão), autoinjeter SIL 20-AC (Shimadzu, Japão), controlador CBM 20A (Shimadzu, Japão). O detector utilizado foi um espectrômetro de massas API 3200 (Applied Biosystems, MDS SCIEX, Toronto, Canadá) equipado com uma interface IEN.

4.3 Softwares

Os dados foram adquiridos utilizando o software Analyst® 1.4.2 (Applied Biosystems, MDS SCIEX, Toronto, Canadá). O planejamento dos experimentos e o desenvolvimento dos modelos empíricos foram realizados através dos softwares Statistica® 10 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA) e Modde 10.1.1 (Umetrics, Umeå, Suécia).

4.4 Preparo das soluções e amostras

4.4.1 Preparo das soluções estoque e de trabalho dos fármacos

As soluções estoque de olanzapina, quetiapina e venlafaxina foram obtidas pesando-se, com acuidade, o equivalente a 10 mg de cada fármaco e, depois, transferindo-os para diferentes tubos de ensaio onde, em seguida, foram adicionados 10 mL de acetonitrila e dissolvidos, com auxílio de um banho ultrassônico, de forma a obter uma solução na concentração de 1 mg/mL para cada um deles. Além disso, preparou-se para cada fármaco uma solução de trabalho na concentração de 2 µg/mL, através da diluição das suas respectivas soluções estoque em acetonitrila.

4.4.2 Preparo da solução padrão mista

Uma solução contendo os três fármacos foi preparada adicionando-se 250 µL das suas respectivas soluções de trabalho em tubo com 9,75 mL de acetonitrila, obtendo assim uma solução contendo 50 ng/mL de cada fármaco.

4.4.3 Preparo das amostras para a realização dos experimentos preliminares

As soluções utilizadas no procedimento de infusão direta foram preparadas, para cada composto, diluindo-se uma alíquota de 200 µL das suas respectivas soluções de trabalho em 1800 µL de uma solução de 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila. Em seguida, cada solução acidificada na concentração de 200 ng/mL do devido fármaco foi homogeneizada e transferida para uma seringa de vidro, componente da bomba de infusão, que foi acoplada ao sistema de espectrometria de massas no momento da análise.

4.4.4 Amostras utilizadas na otimização cromatográfica e da fonte de ionização

As amostras utilizadas nos experimentos de otimização cromatográfica e da fonte de ionização foram preparadas diluindo-se dez vezes a solução padrão mista de modo a obter uma solução contendo 5 ng/mL de cada fármaco. As amostras foram sempre preparadas imediatamente antes do início dos experimentos, colocadas em *vials* (1,5 mL), acondicionadas a 4°C no auto-injetor e, finalmente, analisadas.

4.4.5 Preparo das amostras usadas no desenvolvimento do processo de extração

Três diferentes tipos de amostras foram utilizados durante o desenvolvimento do processo de extração: **1) amostras de plasma fortificadas**, preparadas através da adição de 10 uL da solução padrão mista em 90 uL de plasma, obtendo assim amostras contendo 5 ng/mL de cada composto; **2) amostras de plasma “branco”**, obtidas através da adição de 10 uL de acetonitrila em 90 uL de plasma; **3) soluções padrões**, preparadas adicionando-se 10 uL da solução padrão mista em 90 uL de acetonitrila.

O plasma utilizado no preparo dessas amostras foi obtido da seguinte forma. Amostras de sangue foram coletadas de voluntários do NUDFAC utilizando-se tubos cotendo EDTA K3. Em seguida, foram centrifugadas por 5 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para um tubo Falcon (50 mL). Assim, um pool de plasma foi obtido.

4.4.6 Preparo das soluções tampão

4.4.6.1 Tampões usados no preparo da fase móvel

Soluções tampão de formato de amônio com diferentes valores de pH foram utilizadas como componente aquoso da fase móvel durante o estudo. Para preparar essas soluções, primeiramente, foram preparados 10 mL de uma solução aquosa contendo 5 mols/L de formato de amônio (solução A). Essa solução foi devidamente filtrada com auxílio de uma seringa e filtro de PTFE com porosidade de 0,45 µm. Em seguida, preparou-se 10 mL de uma solução aquosa de 5 mols/L de ácido fórmico (solução B).

Na Tabela 2, estão descritos os volumes retirados das soluções A e B necessários para preparar 10 mL de soluções de formato de amônio 100 mmol/L com os diferentes valores de pH estudados nos experimentos de otimização cromatográfica.

Tabela 2: Alíquotas retiradas soluções A e B para preparo de 10 mL de soluções tampão de formato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com diferentes valores de pH.

pH	Concentração (mol L^{-1})	Alíquota da solução A (uL)	Alíquota da solução B (uL)	Volume final (mL)
2,7	0,1	200	2000	10
3,7	0,1	200	200	10
4,7	0,1	200	20	10

O preparo da fase móvel a partir das soluções de formato de amônio 100 mmol/L está descrito na seção 4.5.3.

4.4.6.2 Tampões usados no desenvolvimento do processo de extração

Durante o desenvolvimento do processo de extração, as amostras de plasma foram submetidas a um tratamento com soluções tampão de diferentes valores de pH.

Foram preparadas três diferentes soluções para obtenção de um gradiente de pH para meios ácido, neutro e alcalino: (i) acetato de amônio 100 mmol/L , pH ajustado para 5,4 com ácido acético 5M ; (ii) fosfato de sódio monobásico 100 mmol/L , pH ajustado para 7,4 com hidróxido de sódio $0,8$; (iii) formato de amônio 100 mmol/L , pH ajustado para 9,4 com hidróxido de amônio 5M .

Todas as soluções tampão utilizadas neste estudo tiveram o pH verificado com auxílio de um potenciômetro.

4.5 Descrição da estratégia de otimização

A qualidade de um método bioanalítico que utiliza a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série deve ser preferencialmente avaliada por múltiplos critérios, devido ao grande número de parâmetros que podem afetar a eficiência do sistema como um todo. Assim, a utilização de uma estratégia multisegmentada permite otimizar o desenvolvimento de métodos bioanalíticos por CLAE-EM/EM com base em diferentes critérios.

A estratégia foi compreendida em cinco etapas: i) experimentos preliminares ii) otimização dos parâmetros cromatográficos; iii) otimização dos parâmetros da fonte de ionização; iv) reavaliação dos parâmetros de *declustering potencial*; v) desenvolvimento do processo de extração (Figura 13).

Nas etapas ii, iii, v foram realizados planejamentos experimentais estatísticos, desenvolvidos modelos empíricos e construídas superfícies de resposta que auxiliaram na determinação das melhores condições de trabalho para o sistema CLAE-EM/EM.

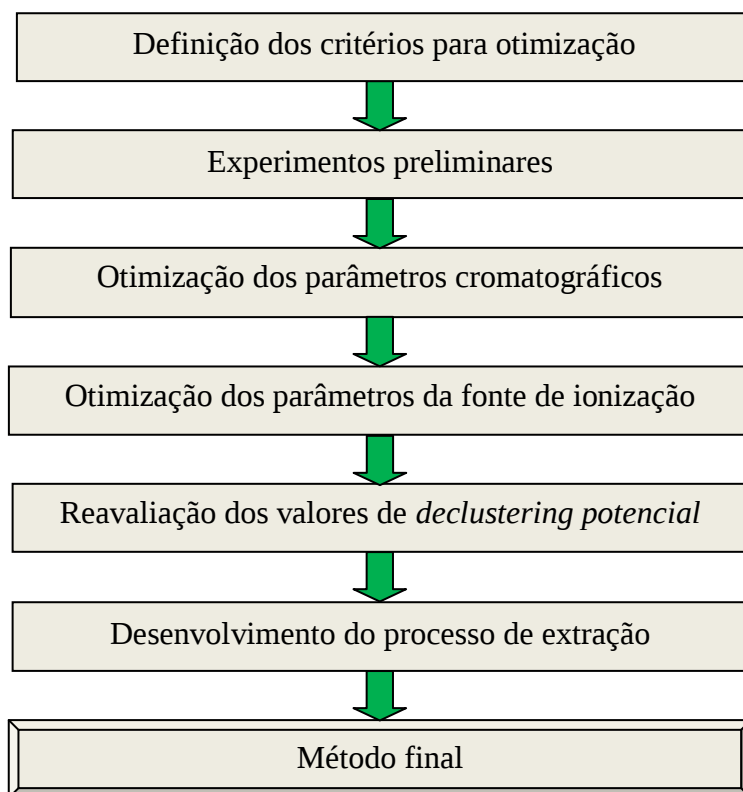


Figura 13: Fluxograma da estratégia de otimização utilizada neste estudo

4.5.1 Definição dos critérios para otimização

Nesta etapa foram definidos os critérios para avaliar as melhores condições a serem obtidas em cada etapa. A discussão detalhada desta etapa está descrita na seção 5.1.

4.5.2 Experimentos preliminares

Primeiramente, foi realizado um experimento visando comparar a sensibilidade dos fármacos ao se utilizar duas diferentes técnicas de ionização à pressão atmosférica, IEN e ICPA.

A infusão direta de ambos os analitos e do PI foi realizada utilizando uma seringa de infusão e as soluções descritas na seção 4.4.3 Preparo das amostras para a realização dos

experimentos preliminares). Cada composto foi monitorado em modo positivo e negativo tanto para IEN quanto IQPA.

Após a definição da técnica de ionização com maior eficiência de ionização, foram obtidos os fragmentos mais intensos de cada fármaco, através do procedimento automático de otimização oferecido pelo software (*Analyst*[®]). Para cada transição monitorada (SRM), foram também obtidos os valores ótimos dos seguintes parâmetros: *declustering potencial* (DP), *entrance potencial* (EP), *cell entrance potencial* (CEP), *cell exit potencial* (CXP) e energia de colisão (CE).

Durante essa etapa, os parâmetros da fonte permaneceram nos valores definidos pelo método de infusão padrão, determinado pelo fabricante do espectrômetro de massas.

4.5.3 Otimização dos parâmetros cromatográficos

Baseado em investigações anteriores realizadas pelo grupo do NUDFAC, foram definidas as condições cromatográficas iniciais. Além disso, alguns experimentos foram conduzidos a fim de determinar os valores do volume de injeção e fluxo da fase móvel. O modo de eluição isocrático foi eleito pela maior conveniência apresentada em relação à utilização de gradiente. Os fatores escolhidos para serem investigados com mais detalhes foram o pH da fase aquosa e a teor de componente orgânico na fase móvel (%ACN). Após a concretização do planejamento experimental mostrado na Tabela 3, foram desenvolvidos modelos matemáticos relacionando as respostas investigadas com ambos os fatores.

Tabela 3: Planejamento composto central de face centrada utilizado na etapa de otimização cromatográfica. ^a em parênteses estão os níveis dos fatores codificados.

Níveis dos fatores	
pH	%ACN
2,7 (-1) ^a	80 (-1)
2,7 (-1)	90 (+1)
4,7 (+1)	80 (-1)
4,7 (+1)	90 (+1)
2,7 (-1)	85 (0)
4,7 (+1)	85 (0)
3,7 (0)	80 (-1)
3,7 (0)	90 (+1)
3,7 (0)	85 (0)
3,7 (0)	85 (0)
3,7 (0)	85 (0)
3,7 (0)	85 (0)

Para cada experimento, 50 mL de fase móvel foram produzidos. De uma forma geral, adicionava-se 5 mL de umas das soluções tampão de formato de amônio 100mmol/L, descritas na seção 4.4.6.1 Tampões usados no preparo da fase móvel), em um recipiente de vidro e, em seguida, colocava-se a quantidade de acetonitrila prevista no planejamento experimental. Por fim, completava-se o volume de 50 mL com água. A mistura era levada ao banho de ultrassom por 5 minutos antes de ser colocada no equipamento. Antes de cada experimento, a coluna era acondicionada por 30 minutos. Réplicas autênticas foram feitas para os pontos centrais e os experimentos foram conduzidos aleatoriamente.

Após definidos os melhores valores de pH da fase aquosa e teor de acetonitrila na fase móvel, o tempo de aquisição para cada SRM foi definidamente ajustado segundo a Equação 9:

$$t = \frac{W_B}{18 \times N_{SRM}} \quad (9)$$

Onde, t é o tempo de aquisição em segundos; W_B é a largura da base do pico em segundos; N_{SRM} é o número de transições SRM do método.

4.5.4 Otimização dos parâmetros da fonte de ionização

De modo a possibilitar uma posterior comparação entre a otimização automática (e univariada) conduzida pelo software e a multivariada, proposta neste trabalho, a primeira foi realizada logo após a definição dos parâmetros cromatográficos¹.

A geometria da fonte de ionização foi definida variando-se a posição das sondas X e Y (uma de cada vez) em quatro níveis, como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4: Níveis investigados dos fatores posição da sonda X e Y.

Níveis dos fatores	
Sonda X (mm)	Sonda Y (mm)
2	0
4	2
6	4
8	6

A influência exercida pelos parâmetros clássicos da fonte de ionização na eficiência de formação de íons dos compostos analisados foi estudada detalhadamente através de modelos empíricos construídos a partir de uma série de experimentos devidamente planejados. Inicialmente, foi executado um planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} (Tabela 5) de forma a obter um modelo inicial, o qual foi, posteriormente, avaliado e utilizado para orientar o caminho de máxima inclinação em relação à resposta investigada. Os experimentos foram realizados aleatoriamente.

No fim dessa etapa, foi realizado um experimento visando comparar a otimização univariada, promovida pelo software, com a multivariada, realizada no decorrer desta etapa. O método obtido pela otimização automática e o método obtido no fim desta etapa foram utilizados para quantificar uma amostra contendo a mistura dos três fármacos, preparada conforme descrito na seção 4.4.4 Amostras utilizadas na otimização cromatográfica e da fonte de ionização. Posteriormente, foram comparadas as áreas dos analitos obtidas nas diferentes condições. As análises foram realizadas em triplicata e em ordem aleatória.

¹ A pressão do gás de colisão (CAD) foi definida através da otimização automática.

Tabela 5: Planejamento fatorial 25-1 realizado na etapa de otimização da fonte de ionização.

Níveis dos fatores				
CUR (psi)	IS (V)	TEM (°C)	GS1 (psi)	GS2 (psi)
27 (-1)	2500 (-1)	650 (-1)	30 (-1)	45 (+1)
37 (+1)	2500 (-1)	650 (-1)	30 (-1)	35 (-1)
27 (-1)	4500 (+1)	650 (-1)	30 (-1)	35 (-1)
37 (+1)	4500 (+1)	650 (-1)	30 (-1)	45 (+1)
27 (-1)	2500 (-1)	750 (+1)	30 (-1)	35 (-1)
37 (+1)	2500 (-1)	750 (+1)	30 (-1)	45 (+1)
27 (-1)	4500 (+1)	750 (+1)	30 (-1)	45 (+1)
37 (+1)	4500 (+1)	750 (+1)	30 (-1)	35 (-1)
27 (-1)	2500 (-1)	650 (-1)	40 (+1)	45 (+1)
37 (+1)	2500 (-1)	650 (-1)	40 (+1)	45 (+1)
27 (-1)	4500 (+1)	650 (-1)	40 (+1)	35 (-1)
37 (+1)	4500 (+1)	650 (-1)	40 (+1)	45 (+1)
27 (-1)	2500 (-1)	750 (+1)	40 (+1)	35 (-1)
37 (+1)	2500 (-1)	750 (+1)	40 (+1)	35 (-1)
27 (-1)	4500 (+1)	750 (+1)	40 (+1)	35 (-1)
37 (+1)	4500 (+1)	750 (+1)	40 (+1)	45 (+1)

4.5.5 Reavaliação dos valores de *declustering potencial* (DP)

Após terem sido definidas tanto as condições cromatográficas quanto da fonte de ionização, foi novamente realizada a infusão direta de cada fármaco, com o propósito de avaliar se houve alguma modificação nos valores previamente definidos de DP, causada pelas novas condições do método. Porém, desta vez, o equipamento foi configurado de modo a permitir a infusão da amostra e da fase móvel, no fluxo definido pelo método de infusão pós coluna (Figura 14).

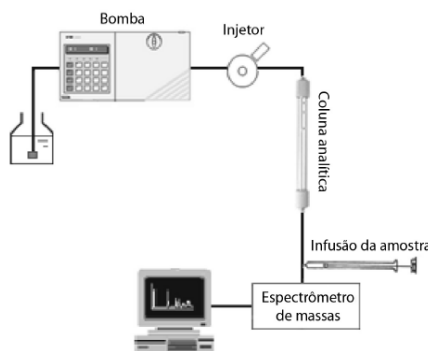


Figura 14: Representação esquemática da configuração do sistema no experimento de reavaliação dos valores de DP.

A verificação foi feita manualmente, para cada fármaco, por meio da visualização de um gráfico relacionando DP (volts) com intensidade de sinal (cps) obtido através da variação dos valores de DP em uma faixa compreendida entre 0 a 200 volts, de forma discreta, em variações de 2 volts. As amostras foram preparadas conforme descrito na seção 4.4.3 Preparo das amostras para a realização dos experimentos preliminares).

4.6 Desenvolvimento do processo de extração

Um planejamento fatorial 3^2 foi realizado para sondar a influencia do pH do meio e do tipo de solvente usado para extrair os fármacos da matriz biológica na eficiência do processo de extração. A Tabela 6 mostra os experimentos delineados para esta etapa.

Tabela 6: Planejamento fatorial 3^2 realizado na etapa de desenvolvimento do método de extração.

Níveis dos fatores	
Solvente extrator	pH da solução tampão
Diclorometano (0)	5,4 (-1)
Clorofórmio (+1)	7,4 (0)
MTBE (-1)	9,4 (+1)
MTBE (-1)	7,4 (0)
Clorofórmio (+1)	5,4 (-1)
Diclorometano (0)	9,4 (+1)
Clorofórmio (+1)	9,4 (+1)
MTBE (-1)	5,4 (-1)
Diclorometano (0)	7,4 (0)

Para possibilitar o cálculo da eficiência do processo, resposta avaliada nesta etapa, foi preciso preparar três conjuntos de amostra diferentes. O primeiro conjunto foi preparado para avaliar a resposta do detector com relação aos três fármacos injetados sem os interferentes do plasma. Essas amostras foram preparadas conforme descrito na seção 4.4.5 Preparo das amostras usadas no desenvolvimento do processo de extração). O segundo conjunto foi preparado retirando-se uma alíquota de 10 uL do extrato obtido após a extração de amostras de plasma não contaminadas e, em seguida, adicionando-se ao tubo 10 uL da solução mista (seção

4.4.2 *Preparo da solução padrão* mista), obtendo assim uma solução contendo 5 ng/mL de cada fármaco em extrato de plasma. O terceiro conjunto consistiu no extrato obtido após a extração das amostras de plasma contaminadas. Os experimentos mostrados na Tabela 6 foram realizados em duplicada e de forma aleatória.

4.6.1 Descrição genérica do processo de extração a ser otimizado neste estudo

Em um tubo polipropileno, foram colocados 100 μ L da amostra de plasma (fortificada ou “branco”, preparada conforme seção 4.4.5 Preparo das amostras usadas no desenvolvimento do processo de extração). Em seguida, foram adicionados ao mesmo tubo 100 μ L de uma solução tampão com o valor de pH desejado. O preparo da fase móvel a partir das soluções de formato de amônio 100 mmol/L está descrito na seção 4.5.3.

4.4.6.2 Tampões usados no desenvolvimento do processo de extração). A mistura foi agitada por 10 segundos. Posteriormente, adicionou-se a 800 μ L do solvente extrator. Com auxílio de um agitador orbital, a mistura foi agitada por 5 minutos e, logo depois, foi centrifugada a 14000 rpm durante 5 minutos. O tubo foi levado a um ultrafreezer (-80 °C), onde permaneceu por 10 minutos. Em seguida, verteu-se o tubo cuidadosamente de forma que apenas o solvente extrator fosse transferido para um tubo de ensaio limpo. Finalmente, com ajuda de um concentrador de amostras, evaporou-se o solvente extrator. O precipitado foi ressuspendido com 100 μ L de acetonitrila.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Definição dos critérios da otimização

De forma a evitar a co-eluição dos fármacos analisados, o que poderia acarretar uma supressão ou incremento de sinal, devido à competição dos diferentes íons para serem dessolvatados (KEBARLE; TANG, 1993), fez-se necessário selecionar um critério para avaliar a qualidade da separação cromatográfica.

A resolução entre picos adjacentes (R_s) é uma ferramenta bastante eficaz para se avaliar a qualidade da separação cromatográfica, pois determina o quanto os picos estão separados tendo as suas bases como referência.

A separação total entre dois picos cromatográficos está relacionada com valores de resolução iguais ou superiores a dois (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

Na estratégia proposta, foi estabelecido como critério para otimizar a separação cromatográfica a maximização da resolução entre picos adjacentes.

Há muitas formas na literatura para se calcular a resolução entre picos, considerando a hipótese de simetria de picos ou não (SONG; WANG, 2003). Porém, neste estudo, por questão de conveniência, a resolução foi calculada através da Equação 10 (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010):

$$R_s = \frac{1,18 (t_{R2} - t_{R1})}{w_{0,5;1} + w_{0,5;2}} \quad (10)$$

Onde, t_{R1} — tempo de retenção do primeiro composto eluído; t_{R2} — tempo de retenção do segundo composto eluído; $w_{0,5;1}$ — largura à meia altura do primeiro pico; $w_{0,5;2}$ — largura à meia altura do segundo pico.

Um critério complementar à maximização da resolução foi estabelecido de forma a evitar o desenvolvimento de um método com um longo tempo de análise. A duração total de uma corrida cromatográfica está diretamente relacionada com o tempo de retenção do último analito a ser eluído. Assim, determinou-se o segundo critério da estratégia proposta: a minimização do tempo de retenção do último analito a ser eluído.

A escolha do terceiro critério teve como base o fato de que os medicamentos de olanzapina terem menores dosagens comerciais em comparação com os medicamentos de quetiapina e, conseqüentemente, menores concentrações plasmáticas, demandando, assim,

limites inferiores de quantificação mais baixos (BRASIL, 2014; GUNASEKARA; SPENCER 1998). Em virtude disso, a maximização da área da olanzapina foi estabelecido como um dos objetivos a ser alcançado pela estratégia proposta.

Os três últimos critérios estão relacionados com o desenvolvimento do processo de extração. Como o propósito de se realizar tal processo é pré-tratar a amostra para reduzir o risco de ocorrência de efeito matriz (ME), essa resposta foi selecionada como um dos critérios para avaliar a qualidade do processo de extração. A recuperação (RE) foi definida como critério complementar, pois de nada adianta reduzir o efeito matriz, se não há uma suficiente recuperação dos analitos no processo. Além disso, uma análise conjunta dessas duas respostas pode ser obtida através da variável denominada eficiência do processo (PE), que também foi utilizada como neste estudo. As Equações 11-13 mostram como foram calculadas essas respostas no presente estudo (MATUSZEWSKI; CONSTANZER, 2003).

$$ME(\%) = \frac{B}{A} \times 100 \quad (11)$$

$$RE(\%) = \frac{C}{B} \times 100 \quad (12)$$

$$PE(\%) = \frac{C}{A} \times 100 \quad (13)$$

Onde: A - área do pico cromatográfico obtida através da análise de uma amostra da solução padrão; B- área do pico cromatográfico obtida através da análise de uma amostra de extrato de plasma fortificado após a extração; C- área do pico cromatográfico obtida através da análise de uma amostra de extrato de plasma fortificado antes da extração.

5.2 Experimentos preliminares

Primeiramente, procurou-se definir qual das técnicas de ionização à pressão atmosférica IEN ou IQPA era mais adequada para a análise dos fármacos olanzapina e quetiapina. Ambas as técnicas foram testadas no modo positivo e negativo, porém para nenhuma delas foi obtido sinal no modo negativo. Os resultados desse experimento para o modo positivo estão descritos na Tabela 8. Pode-se verificar que a IEN apresenta uma maior intensidade de sinal, para ambos os analitos, em comparação com IQPA. A técnica de ionização por eletronebulização é indicada para moléculas muito polares e facilmente ionizadas (MCMASTER, 2005). As moléculas de olanzapina, quetiapina e venlafaxina são facilmente protonadas em meios com pH inferior a 7, gerando cátions de amônio quaternário,

como mostrado na Figura 15. Devido a isso, esperava-se que o modo de ionização IEN positivo apresentasse, de fato, uma boa eficiência de ionização para esses compostos. Com relação à técnica de ionização química à pressão atmosférica, verificou-se a ocorrência da fragmentação dos analitos ainda na fonte de ionização, o que causou a diminuição da sensibilidade de ambos os analitos.

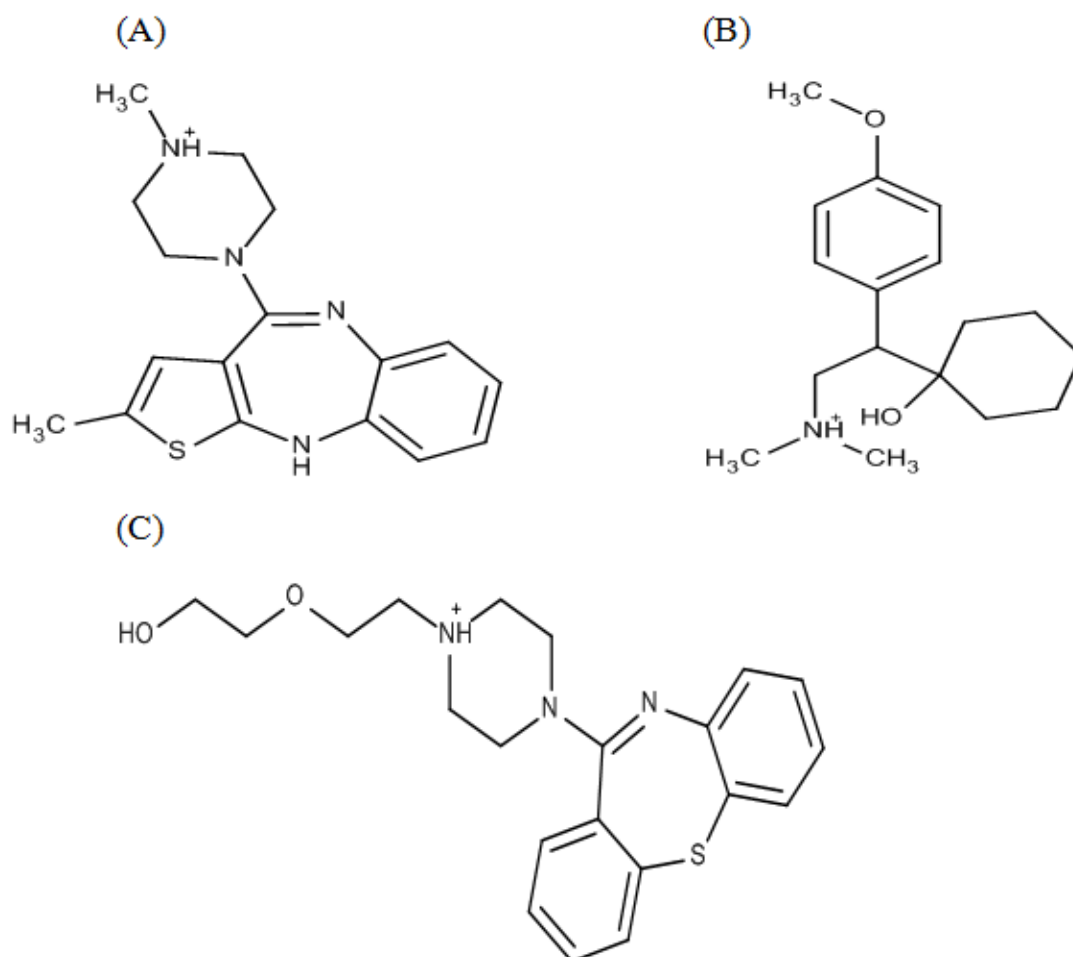


Figura 15- Moléculas de olanzapina (A), quetiapina (B) e venlafaxina (C) protonadas (obtidas pelo Marvin[®]).

Tabela 7: Resultados da comparação das técnicas de ionização IEN x IQAP.

Técnica de ionização	Intensidade (cps)	
	OLZ (313 > 256)	QTP (384>253)
IEN +	25130	16842
IQAP +	12792	11510

Com a ionização definida, os fragmentos mais intensos para cada fármaco foram obtidos, através da otimização automática disponibilizada pelo Analyst®, assim como os valores para uma série de parâmetros, nominalmente, *declustering potencial* (DP), *entrance potencial* (EP), *cell entrance potencial* (CEP), *colision energy* (CE), *cell exit potencial* (CXP), como mostrado na Tabela 8. Assim, um método MRM, contendo três SRM, foi estabelecido.

Tabela 8: Valores dos parâmetros do EM-EM obtidos através da otimização automática.

ID	Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	DP (volts)	EP (volts)	CEP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)	Tempo (mseg)
OLZ	313,167	256,1	55	6,5	18	27	4	500
QTP	384,08	253,1	60	6,5	18	31	6	500
VLX	278,184	260,2	39	6	16	15	6	500

5.3 Otimização dos parâmetros cromatográficos

Essa etapa teve como objetivo obter a separação cromatográfica entre os picos dos fármacos, porém com o menor tempo de análise possível.

Vários fatores têm influencia sobre a resolução e tempo de retenção dos analitos, nominalmente, fase estacionária, temperatura de trabalho da coluna cromatográfica, composição e fluxo da fase móvel, pH e concentração da solução tampão, quando utilizada.

Baseado em dados internos do NUDFAC, recentemente publicados (BEDOR et al.,2015), utilizou-se uma coluna cromatográfica com fase estacionária C18 e fase móvel água:acetonitrila (50:50) v/v + 0,1% de ácido fórmico, porém, após alguns ensaios, foi verificado que não houve uma retenção adequada para a olanzapina, isto é, $k_{OLZ} \approx 0$, mesmo após a variação da composição e pH da fase móvel. Porém, de forma a promover a separação dos analitos frente aos interferentes biológicos, foi proposta a utilização de um tipo especial de fase estacionária a “*Hydrophilic Interaction Chromatography*, HILIC” (MCCALLEY, 2010). A HILIC é muito indicada para compostos básicos, por proporcionar uma adequada retenção ($k \geq 1$) e picos mais simétricos, em comparação com a cromatografia de fase reversa. Além disso, foi demonstrado que uma fase móvel composta de uma mistura de acetonitrila e

uma solução aquosa de formato de amônio, juntamente com colunas com fase estacionária HILIC, oferecem uma boa alternativa para compostos ionizáveis e, especialmente, bases, tais como as moléculas de olanzapina e quetiapina, objetos de estudo deste trabalho. (MCCALLEY, 2007).

A partir das informações citadas acima, foi definida a coluna cromatografia a ser utilizada no estudo (HILIC 100 x 2,1 mm, 2,6 μ m, Phenomenex®) e a composição da fase móvel — uma mistura de acetonitrila e uma solução aquosa de formato de amônio. O formato de amônio é um tampão volátil e, por isso, adequado ao sistema IEN-EM (MCMMASTER, 2005).

Uma fase móvel composta de 85% de acetonitrila e 15% de uma solução tampão de formato de amônio 5 mmol/L com pH 4,7 foi preparada com o propósito de realizar um experimento para definir o volume de injeção e fluxo mais adequado. O fluxo da fase móvel foi ajustado para 0,2 mL/ min, de forma a obter uma pressão apropriada para sistema CLAE-IEN-EM (200 kgf cm⁻²). O volume de injeção foi, inicialmente, ajustado para 20 μ L, porém, após alguns testes, verificou-se que este volume era inadequado, pois causava uma sobrecarga na coluna. Assim, o volume foi diminuído gradativamente e os resultados comparados entre 5 e 10 μ L mostraram-se semelhantes. Diante disso, optou-se pela utilização do menor volume.

Diante da definição da fase estacionária, fluxo e volume de injeção, foi realizado um planejamento composto central de face centrada para investigar a influencia do teor de acetonitrila e o pH da solução tampão na resolução e tempo de retenção dos fármacos investigados. Os resultados estão mostrados na Tabela 9.

Tabela 9: Resultados do planejamento composto central

Níveis dos fatores		Respostas				
pH	%ACN	RQTP,VLX	RVLX,OLZ	t _{R,QTP}	t _{R,VLX}	t _{R,OLZ}
2,7 (-1) a	80 (-1)	0,07	6,94	2,32	2,34	5,32
2,7 (-1)	90 (+1)	0,01	12,19	2,84	2,84	9,98
4,7 (+1)	80 (-1)	0,91	2,84	2,24	2,55	3,75
4,7 (+1)	90 (+1)	5,06	5,36	2,66	4,29	6,32
2,7 (-1)	85 (0)	0,05	10,57	2,64	2,66	7,55
4,7 (+1)	85 (0)	2,05	2,94	2,38	3,13	4,46
3,7 (0)	80 (-1)	0,28	3,52	2,36	2,46	4,05
3,7 (0)	90 (+1)	1,45	9,17	3,47	3,97	7,90
3,7 (0)	85 (0)	0,44	5,13	2,74	2,89	5,25
3,7 (0)	85 (0)	0,58	5,00	2,77	2,96	5,20
3,7 (0)	85 (0)	0,34	4,80	2,60	2,71	4,94
3,7 (0)	85 (0)	0,47	4,35	2,69	2,86	5,08

R_{QTP,VLX} – Resolução entre picos da quetiapina e venlafaxina; R_{VLX,OLZ} – Resolução entre picos da venlafaxina e olanzapina; t_{R,QTP} – Tempo de retenção da quetiapina; t_{R,VLX} – Tempo de retenção da venlafaxina; t_{R,OLZ} – Tempo de retenção da olanzapina.

Supondo-se que a relação entre a R_{QTP,VLX} e os fatores investigados poderia ser representada localmente por uma função polinomial de segunda ordem (Equação 4), estimou-se os coeficientes para construção de tal modelo através do método dos mínimos quadrados. Os coeficientes obtidos estão mostrados na Tabela 10. Os resultados mostram que, no nível de 95% confiança, todos os termos foram considerados significativos, pois apresentaram valor de p menor que 0,05. Entretanto, antes de utilizar estes coeficientes para fazer previsões, verificou-se se o modelo estava bem ajustado aos dados. Isto foi feito através de uma análise da variância.

Tabela 10: Tabela dos coeficientes do modelo ajustado para $R_{QTP,VLX}$. Onde (L) representam os termos lineares e (Q) representam os termos quadráticos.

	Coeficientes	Erro padrão	t(3)	p	- 95% Limite de confiança	+95% Limite de confiança
Média	0,45	0,04	10,01	0,002124	0,31	0,59
pH (L)	1,32	0,04	32,88	0,000062	1,19	1,44
pH (Q)	0,62	0,06	10,31	0,001945	0,43	0,81
%ACN (L)	0,87	0,04	21,86	0,000210	0,75	1,00
%ACN (Q)	0,44	0,06	7,28	0,005340	0,25	0,63
pH x %ACN	1,05	0,05	21,48	0,000221	0,90	1,21

Após a realização de uma análise de variância, detectou-se uma falta de ajuste no modelo (Tabela 11). O gráfico de resíduos (Figura 16) mostra um perfil sistemático, que se inicia com valores positivos, depois passam a ser negativos, e voltam a ficar positivos, confirmando, assim, a falta de ajuste. De forma solucionar este problema, foi realizada uma transformação da variável dependente.

O método de Box-Cox foi utilizado para determinar a melhor transformação a ser feita para a $R_{QTP,VLX}$. O valor máximo de λ obtido através desse método foi de 0,53, indicando, assim, a utilização da raiz quadrada da resolução como resposta adequada (BOX; DRAPER, 2007).

Tabela 11: ANOVA do modelo ajustado para $R_{QTP,VLX}$.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de G.L.	Média quadrática	F	P
pH (L)	10,37602	1	10,37602	1081,190	0,000062
pH (Q)	1,02064	1	1,02064	106,352	0,001945
%ACN (L)	4,58520	1	4,58520	477,782	0,000210
%ACN (Q)	0,50925	1	0,50925	53,064	0,005340
pH x %ACN	4,42770	1	4,42770	461,370	0,000221
F. de ajuste	0,56158	3	0,18719	19,506	0,018013
Erro puro	0,02879	3	0,00960		
Total	22,24114	11			
R^2	0,973				
R^2 ajustado	0,951				

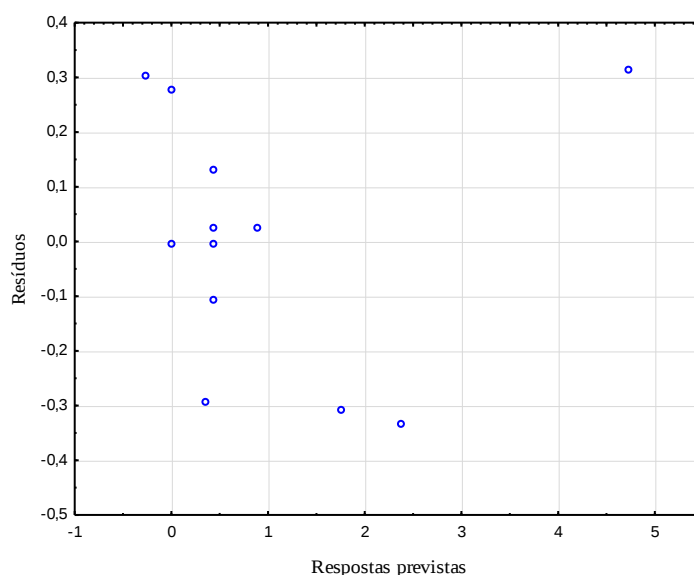


Figura 16: Gráfico de resíduos modelo ajustado para RQTP,VLX.

Um novo modelo foi construído para a resolução transformada $[(R_{QTP,VLX})^{1/2}]$. Os coeficientes obtidos para este novo modelo estão mostrados na Tabela 12. Uma análise de variância foi conduzida e verificou-se que não havia falta de ajuste para o modelo (Tabela 13).

Os termos quadráticos de pH e %ACN não foram considerados significativos no nível de 95% de confiança. Sendo assim, o termo de menor coeficiente — isto é pH (Q) — foi retirado do modelo e uma nova análise de variância foi realizada (Tabela 14). Não foi detectada falta de ajuste e o novo modelo apresentou todos os termos significativos ($p < 0,05$). Os coeficientes do modelo final para $(R_{QTP,VLX})^{1/2}$ estão mostrados na Tabela 15. Uma curva de nível foi construída a partir do modelo desenvolvido (Figura 17).

Tabela 12: Coeficientes do modelo quadrático inicial para $(R_{QTP,VLX})^{1/2}$.

	Coeficientes	Erro padrão	t(3)	P	- 95% Limite de confiança	+95% Limite de confiança
Média	0,70	0,03	20,85	0,000241	0,59	0,80
pH (L)	0,68	0,03	22,72	0,000187	0,58	0,77
pH (Q)	0,09	0,04	1,94	0,147080	-0,06	0,23
%ACN (L)	0,30	0,03	9,92	0,002178	0,20	0,39
%ACN (Q)	0,13	0,04	2,84	0,065902	-0,02	0,27
pH x %ACN	0,37	0,04	10,13	0,002049	0,25	0,49

Tabela 13: ANOVA do modelo quadrático inicial para $(R_{QTP,VLX})^{1/2}$

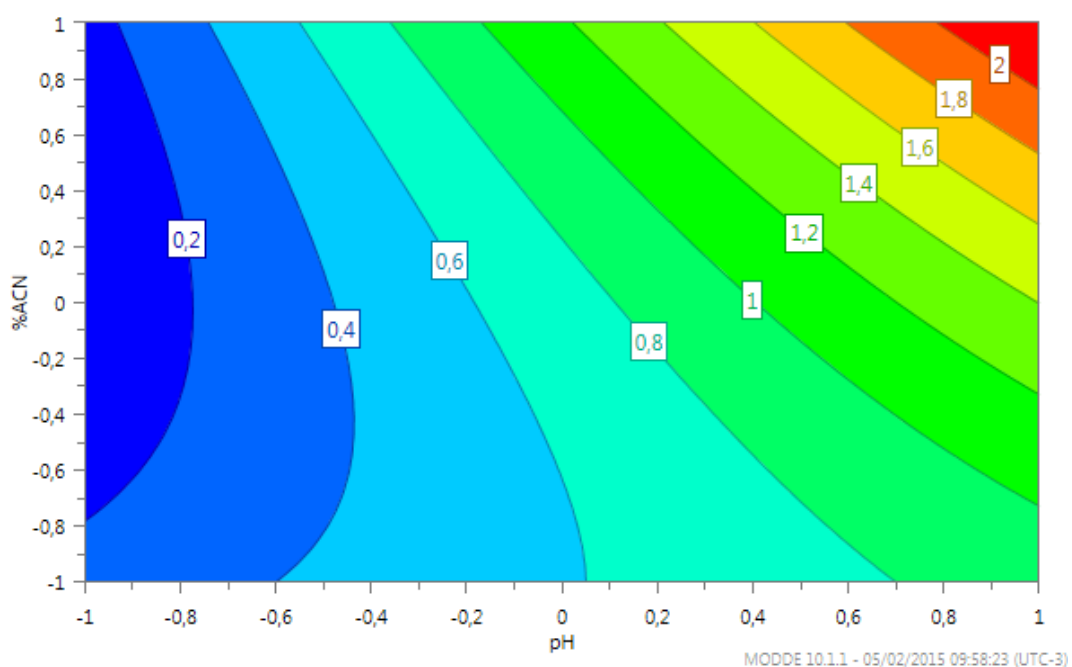
Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de G.L.	Média quadrática	F	P
pH (L)	2,756954	1	2,756954	516,2612	0,000187
pH (Q)	0,020189	1	0,020189	3,7806	0,147080
%ACN (L)	0,525672	1	0,525672	98,4362	0,002178
%ACN (Q)	0,042929	1	0,042929	8,0388	0,065902
pH x %ACN	0,548026	1	0,548026	102,6222	0,002049
F. de ajuste	0,034895	3	0,011632	2,1781	0,269527
Erro puro	0,016021	3	0,005340		
Total	3,974657	11			
R^2	0,987				
R^2 ajustado	0,976				

Tabela 14: ANOVA do novo modelo quadrático para $(R_{QTP,VLX})^{1/2}$.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de G.L.	Média quadrática	F	P
pH (L)	2,756954	1	2,756954	516,2612	0,000187
%ACN (L)	0,525672	1	0,525672	98,4362	0,002178
%ACN (Q)	0,072899	1	0,072899	13,6509	0,034404
pH x %ACN	0,548026	1	0,548026	102,6222	0,002049
F. de ajuste	0,055085	4	0,013771	2,5788	0,231224
Erro puro	0,016021	3	0,005340		
Total	3,974657	11			
R^2	0,982				
R^2 ajustado	0,972				
Q^2	0,939				

Tabela 15: Coeficientes do novo modelo quadrático para $(R_{QTP,VLX})^{1/2}$.

	Coeficientes	Erro padrão	t(3)	P	- 95% Limite de confiança	+95% Limite de confiança
Média	0,72	0,03	24,29	0,000153	0,63	0,82
pH (L)	0,68	0,03	22,72	0,000187	0,58	0,77
%ACN (L)	0,30	0,03	9,92	0,002178	0,20	0,39
%ACN (Q)	0,16	0,04	3,69	0,034404	0,02	0,29
pH x %ACN	0,37	0,04	10,13	0,002049	0,25	0,49

Figura 17: Curva de nível para $(R_{QTP,VLX})^{1/2}$.

Um procedimento análogo foi realizado para construir um modelo para a $R_{VLX,OLZ}$. Os dados referentes à análise de variância e os coeficientes do modelo final estão mostrados nas Tabelas 16 e 17, respectivamente. A curva de nível derivada do modelo está mostrada na Figura 18.

Tabela 16: ANOVA do modelo obtido para $(R_{VLX,OLZ})^{1/2}$.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de G.L.	Média quadrática	F	P
pH (L)	2,233697	1	2,233697	357,5851	0,000323
pH (Q)	0,164919	1	0,164919	26,4013	0,014281
%ACN (L)	1,161328	1	1,161328	185,9132	0,000853
F. de ajuste	0,235220	5	0,047044	7,5311	0,063598
Erro puro	0,018740	3	0,006247		
Total	3,813904	11			
R ²	0,933				
R ² ajustado	0,908				
Q ²	0,834				

Tabela 17: Coeficientes do modelo obtido para $(R_{VLX,OLZ})^{1/2}$.

	Coeficientes	Erro padrão	t(3)	P	- 95% Limite de confiança	+95% Limite de confiança
Média	2,28	0,03	70,69	0,000006	2,18	2,38
pH (L)	-0,61	0,03	-18,91	0,000323	-0,71	-0,51
pH (Q)	0,23	0,05	5,14	0,014281	0,09	0,38
%ACN (L)	0,44	0,03	13,63	0,000853	0,34	0,54

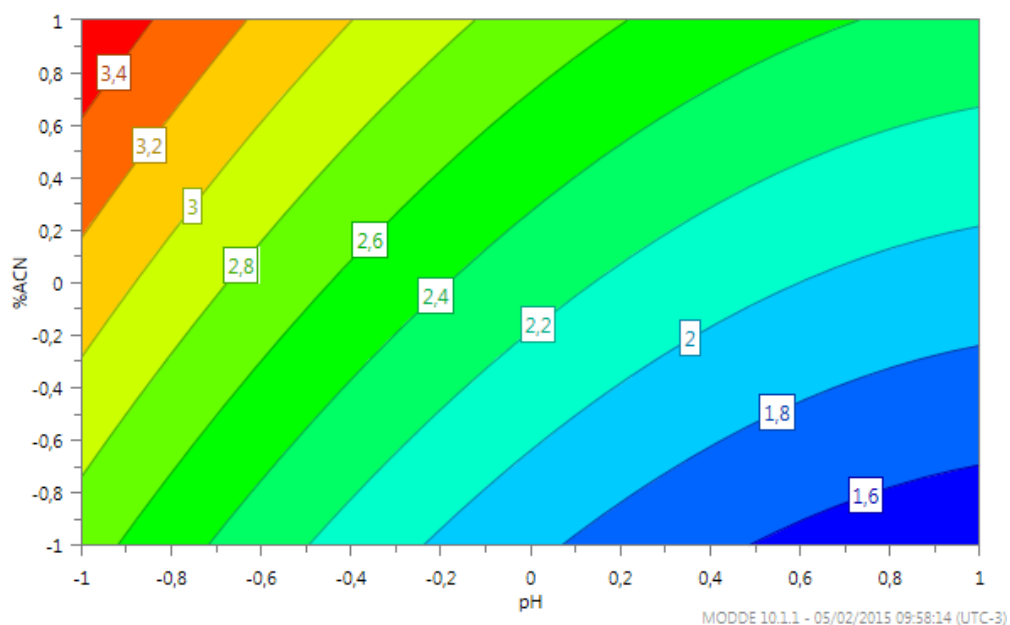


Figura 18: Curva de nível obtida para $(RVLX, OLZ)^{1/2}$.

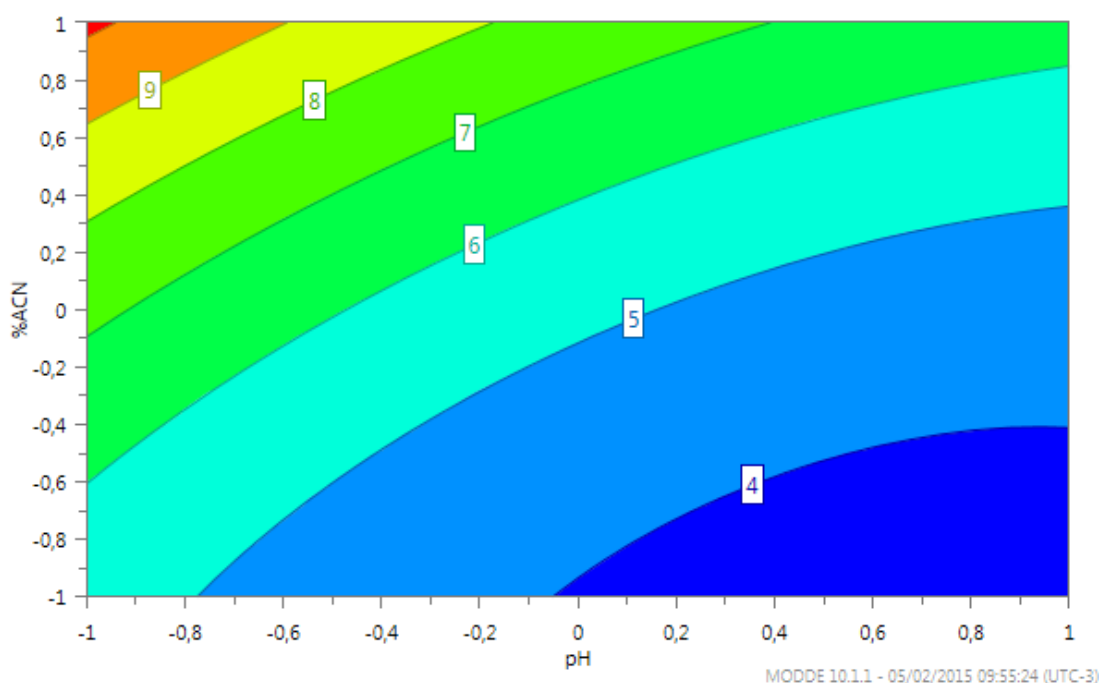
Como em todos os experimentos a olanzapina foi o último analito a ser eluído, um modelo relacionando os fatores estudados com seu tempo de retenção da olanzapina foi construído. Os dados da análise de variância e coeficientes do modelo estão mostrados nas Tabelas 18 e 19. A curva de nível relacionando o t_{ROLZ} com pH e %ACN da fase móvel está mostrada na Figura 19.

Tabela 18: ANOVA do modelo obtido para $t_{R,OLZ}$.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de G.L.	Média quadrática	F	P
pH (L)	11,53429	1	11,53429	583,338	0,000156
pH (Q)	1,04167	1	1,04167	52,681	0,005396
%ACN (L)	20,50911	1	20,50911	1037,232	0,000066
%ACN (Q)	0,95042	1	0,95042	48,067	0,006153
pH x %ACN	1,09098	1	1,09098	55,175	0,005049
F. de ajuste	0,27017	3	0,09006	4,555	0,122434
Erro puro	0,05932	3	0,01977		
Total	36,45122	11			
R^2	0,990				
R^2 ajustado	0,983				
Q^2	0,938				

Tabela 19: Coeficientes do modelo obtido para $t_{R,OLZ}$.

	Coeficientes	Erro padrão	t(3)	P	- 95% Limite de confiança	+95% Limite de confiança
Média	5,21	0,06	81,11	0,000004	5,00	5,41
pH (L)	-1,39	0,06	-24,15	0,000156	-1,57	-1,20
pH (Q)	0,62	0,09	7,26	0,005396	0,35	0,90
%ACN (L)	1,85	0,06	32,21	0,000066	1,67	2,03
%ACN (Q)	0,60	0,09	6,93	0,006153	0,32	0,87
pH x %ACN	-0,52	0,07	-7,43	0,005049	-0,75	-0,30

Figura 19: Curva de nível obtida para $t_{R,OLZ}$.

A superfície mostrada na Figura 20 foi construída a partir da sobreposição das curvas de nível obtidas nesta etapa. A região na qual todas as respostas encontram-se dentro da especificação está denotada pela cor azul (*Sweet spot*). Como ambas as resoluções tiveram que ser transformadas para a construção dos seus respectivos modelos, o critério de obtenção de uma resolução com valor igual ou superior a dois também foi modificado. O novo valor passou a ser 1,4 (pois $\sqrt{2} \cong 1,4$). Com relação ao tempo de retenção da olanzapina, foi

estabelecido como limite superior o valor de 5 minutos (Figura 21). O valores codificados de pH e %ACN selecionados foram 1 e 0,1, correspondendo a 4,7 e 85,5%.

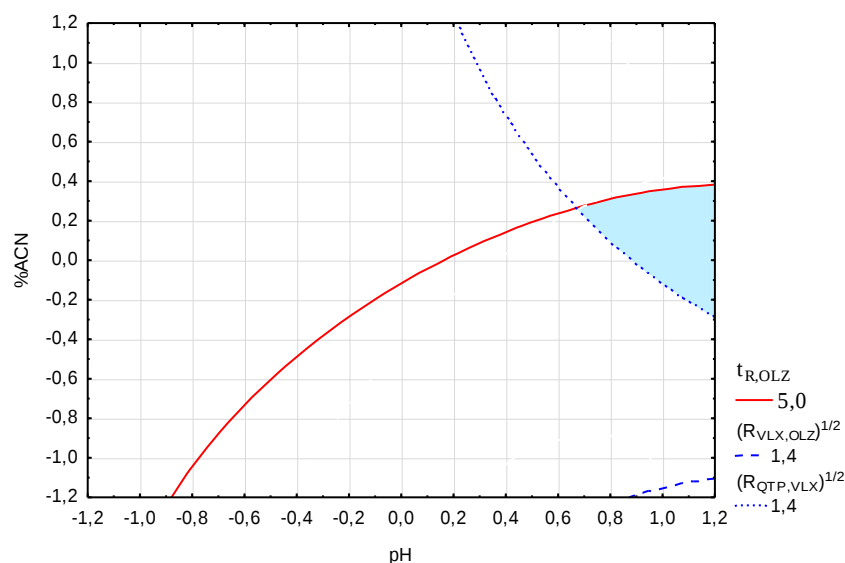


Figura 20: Curva de nível obtida pela sobreposição das curvas da etapa cromatográfica.

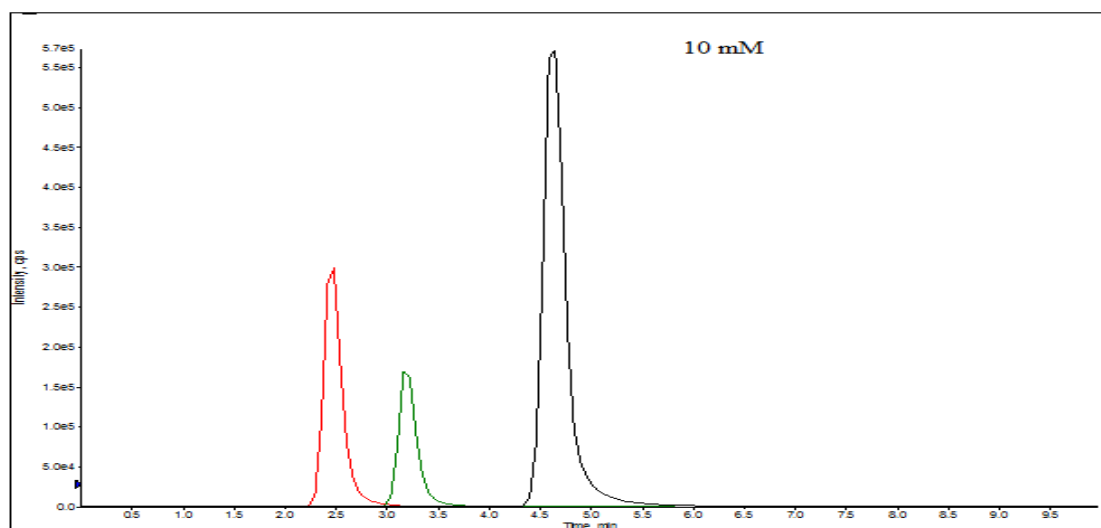


Figura 21: Cromatograma obtido após a etapa de otimização cromatográfica.

5.4 Otimização dos parâmetros da fonte de ionização

Essa etapa teve como objetivo maximizar a área do pico da olanzapina. Para isso, primeiramente investigou-se a influência da geometria da fonte sobre a área da olanzapina, variando-se um fator por vez (sonda X e Y), em quatro diferentes níveis. Os resultados estão descritos na Tabela 20.

Tabela 20: Resultados do experimento de otimização da geometria da fonte.

Posição (mm)	Área OLZ					
	Sonda Y			Sonda X		
0	288580	274810	275150	-	-	-
2	285620	287530	279900	314610	328810	323360
4	268450	268630	288080	396680	394790	391610
6	259390	247820	245840	299290	317440	273570
8	-	-	-	214810	210650	199260

Uma análise de variância foi realizada para cada fator (Tabelas 21 e 22). Verificou-se que houve diferença significativa entre os níveis estudados. Isto é, ambos os fatores demonstraram-se significantes em relação à resposta investigada. A sonda Y apresentou maiores valores de área para a posição 2 mm. Em relação à sonda X, as maiores respostas foram no nível 4 mm. Assim, determinou-se a geometria da fonte de ionização.

Tabela 21: ANOVA realizada para o fator sonda X.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de G.L	Média quadrática	F	P
Entre grupos	5,31E+10	3,00E+00	1,77E+10	1,16E+02	6,13E-07
Dentro dos grupos	1,22E+09	8,00E+00	1,52E+08		
Total	5,44E+10	1,10E+01			

Tabela 22: ANOVA realizada para o fator sonda Y.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de G.L	Média quadrática	F	P
Entre grupos	1,97E+09	3,00E+00	6,58E+08	1,02E+01	4,17E-03
Dentro dos grupos	5,17E+08	8,00E+00	6,46E+07		
Total	2,49E+09	1,10E+01			

Após a definição da geometria da fonte, um planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} foi realizado com o intuito de investigar a influencia dos parâmetros clássicos da fonte de ionização, nominalmente, *curtain gás* (CUR), *ion spray voltage* (IS), temperatura da fonte

(TEM), gás nebulizador (GS1) e gás secante (GS2), sobre a área da olanzapina. Os resultados desse experimento estão mostrados na Tabela 23.

Tabela 23: Resultados do planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} para otimização dos parâmetros clássicos da fonte de ionização.

Níveis dos fatores					Resposta
CUR (psi)	IS (V)	TEM (oC)	GS1 (psi)	GS2 (psi)	Área (OLZ)
27 (-1)	2500 (-1)	650 (-1)	30 (-1)	45 (+1)	296822
37 (+1)	2500 (-1)	650 (-1)	30 (-1)	35 (-1)	270581
27 (-1)	4500 (+1)	650 (-1)	30 (-1)	35 (-1)	248088
37 (+1)	4500 (+1)	650 (-1)	30 (-1)	45 (+1)	264307
27 (-1)	2500 (-1)	750 (+1)	30 (-1)	35 (-1)	346508
37 (+1)	2500 (-1)	750 (+1)	30 (-1)	45 (+1)	314633
27 (-1)	4500 (+1)	750 (+1)	30 (-1)	45 (+1)	353816
37 (+1)	4500 (+1)	750 (+1)	30 (-1)	35 (-1)	288174
27 (-1)	2500 (-1)	650 (-1)	40 (+1)	45 (+1)	282086
37 (+1)	2500 (-1)	650 (-1)	40 (+1)	45 (+1)	266964
27 (-1)	4500 (+1)	650 (-1)	40 (+1)	35 (-1)	248893
37 (+1)	4500 (+1)	650 (-1)	40 (+1)	45 (+1)	255733
27 (-1)	2500 (-1)	750 (+1)	40 (+1)	35 (-1)	385070
37 (+1)	2500 (-1)	750 (+1)	40 (+1)	35 (-1)	312227
27 (-1)	4500 (+1)	750 (+1)	40 (+1)	35 (-1)	305568
37 (+1)	4500 (+1)	750 (+1)	40 (+1)	45 (+1)	327157

Os cinco coeficientes de primeira ordem e os dez coeficientes de interação entre dois fatores foram estimados (Tabela 24). Os resultados descritos nas Tabelas 24 e 25 mostram que, no geral, os coeficientes de primeira ordem foram de magnitude maior do que os de segunda ordem. O que corrobora com a hipótese de que o conjunto de valores dos parâmetros da fonte de ionização definidos pelo método tradicional FIA podem ainda ser passíveis de otimização.

Tabela 24: Coeficientes do modelo de segunda ordem ajustado para área OLZ.

Termos	Coeficientes
(1) CUR	-10442
(2) IS	-11447
(3) TEM	31230
(4) GS1	48
(5) GS2	9293
12	7818
13	-8154
14	3000
15	-3500
23	982
24	-2177
25	2783
34	3313
35	6731
45	-235

Tabela 25: Contribuições dos termos de primeira e segunda ordem para a soma quadrática total.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de G.L.	Média quadrática
Primeira ordem	2,08E+10	5	2,08E+10
Segunda ordem	3,50E+09	10	3,50E+09
Total	2,43E+10	15	

Como aproximação, decidiu-se que os efeitos de segunda ordem poderiam ser ignorados e combinados para se obter uma estimativa do erro padrão com dez graus de liberdade. O erro padrão estimado foi de 4676. Utilizando os coeficientes dos termos de primeira ordem, foi estimada a direção do caminho de máxima inclinação a partir do vetor dos coeficientes [-10442; -11447; 31230; 48; 9293]. Um vetor unitário na direção de máxima inclinação foi obtido [-0,29; -0,32; 0,87; 0; 0,26]. Em seguida, os experimentos mostrados na Tabela 26 foram realizados. Em virtude do fator GS1 ter apresentado um coeficiente muito

próximo de zero, esse fator foi mantido no nível central (0). Com relação à temperatura, houve uma restrição, pois a faixa de trabalho do equipamento tem como limite 750°C. Sendo assim, os experimentos que tiveram esse valor excedido, foram realizados utilizando-se o valor limite.

Tabela 26: Experimentos seguindo o caminho de máxima inclinação. E1-ensaio 1, E2-ensaio 2; E3-ensaio 3; E4-ensaio 4; E5-ensaio 5; E6-ensaio 6.

Etapa	Níveis dos fatores					Área OLZ
	Níveis codificados					
	CUR	IS	TEM	GS1	GS2	
E1	-0,29	-0,32	0,87	0	0,26	385223
E2	-0,58	-0,63	1,00	0	0,52	392983
E3	-0,87	-0,95	1,00	0	0,77	422307
E4	-1,16	-1,27	1,00	0	1,03	436555
E5	-1,45	1,59	1,00	0	1,29	428287
E6	1,74	-1,90	1,00	0	1,55	420409

Os resultados da Tabela 26 mostram que, ao se deslocar seguindo o caminho de máxima inclinação, os valores de área crescem até o quarto ensaio, porém decrescem a partir do quinto ensaio.

Neste ponto, um novo planejamento foi realizado com intuito de investigar com mais detalhes a região em torno das condições estabelecidas pelo experimento E4 e a nova matriz de planejamento juntamente com as repostas obtidas estão apresentadas na Tabela 27. Os experimentos foram realizados em três blocos (dia 1, dia 2, dia 3). A temperatura não foi investigada devido à limitação acima citada.

Tabela 27: Nova matriz de planejamento para otimização dos parâmetros da fonte de ionização.

Níveis dos fatores					Resposta
Dia	CUR (psi)	IS (V)	GS1 (psi)	GS2 (psi)	Área (OLZ)
1	21 (-1)	1980 (-1)	30 (-1)	50 (+1)	385175
1	21 (-1)	1980 (-1)	40 (+1)	40 (-1)	396283
1	21 (-1)	1980 (-1)	30 (-1)	40 (-1)	370660
1	21 (-1)	1980 (-1)	40 (+1)	50 (+1)	344355
1	31 (+1)	1980 (-1)	30 (-1)	40 (-1)	283543
1	31 (+1)	1980 (-1)	40 (+1)	50 (+1)	334321
1	31 (+1)	1980 (-1)	30 (-1)	50 (+1)	339873
1	31 (+1)	1980 (-1)	40 (+1)	40 (-1)	366161
1	26 (0)	2230 (0)	35 (0)	45 (0)	417713
1	26 (0)	2230 (0)	35 (0)	45 (0)	436784
2	21 (-1)	1980 (-1)	30 (-1)	40 (-1)	349471
2	21 (-1)	1980 (-1)	40 (+1)	50 (+1)	327024
2	21 (-1)	1980 (-1)	30 (-1)	50 (+1)	343594
2	21 (-1)	1980 (-1)	40 (+1)	40 (-1)	370211
2	31 (+1)	1980,9 (-1)	30 (-1)	50,2 (+1)	338166
2	31,2 (+1)	1980,9 (-1)	40 (+1)	40,2 (-1)	354389
2	31,2 (+1)	1980,9 (-1)	30 (-1)	40,2 (-1)	320557
2	31,2 (+1)	1980,9 (-1)	40 (+1)	50,2 (+1)	345922
2	26,2 (0)	2230,9 (0)	35 (0)	45,2 (0)	448316
2	26,2 (0)	2230,9 (0)	35 (0)	45,2 (0)	434271
3	16,2 (-2)	2230,9 (0)	35 (0)	45,2 (0)	388829
3	36,2 (+2)	2230,9 (0)	35 (0)	45,2 (0)	358745
3	26,2 (0)	1730,9 (-2)	35 (0)	45,2 (0)	449214
3	26,2 (0)	2730,9 (+2)	35 (0)	45,2 (0)	348135
3	26,2 (0)	2230,9 (0)	25 (-2)	45,2 (0)	296407
3	26,2 (0)	2230,9 (0)	45 (+2)	45,2 (0)	275550
3	26,2 (0)	2230,9 (0)	35 (0)	35,2 (-2)	397571
3	26,2 (0)	2230,9 (0)	35 (0)	55,2 (+2)	399493
3	26,2 (0)	2230,9 (0)	35 (0)	45,2 (0)	381676
3	26,2 (0)	2230,9 (0)	35 (0)	45,2 (0)	353387

Um modelo polinomial de segunda ordem foi ajustado para a área da olanzapina. O efeito dos blocos não foi considerado significativo no nível de 95% de confiança ($p < 0,0244$). Os termos não significativos foram retirados do modelo sequencialmente de forma a obter um modelo com o maior valor de Q^2 (ou R^2 de predição) possível. A análise de variância do modelo utilizado para construir as curvas de nível e os seus coeficientes estão mostrados nas Tabelas 28 e 29, respectivamente.

Tabela 28: ANOVA do modelo ajustado para a área da olanzapina.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de G.L.	Média quadrática	F	p
(1) CUR (L)	2,904242E+09	1	2,904242E+09	2,13020	0,204241
CUR (Q)	3,279523E+09	1	3,279523E+09	2,40546	0,181609
(2) GS1 (L)	1,810273E+08	1	1,810273E+08	0,13278	0,730470
GS1 (Q)	3,039636E+10	1	3,039636E+10	22,29509	0,005234
(3) GS2 (L)	1,000377E+08	1	1,000377E+08	0,07338	0,797311
13	1,051055E+09	1	1,051055E+09	0,77093	0,420114
14	9,016487E+08	1	9,016487E+08	0,66134	0,453056
34	2,970182E+09	1	2,970182E+09	2,17857	0,199971
Falta de ajuste	1,164204E+10	16	7,276277E+08	0,53370	0,844677
Erro puro	6,816828E+09	5	1,363366E+09		
Total	5,841743E+10	29			

$R^2 = 0,684$
 $R^2_{\text{ajustado}} = 0,563$
 $Q^2 = 0,500$

Tabela 29: Coeficientes do modelo ajustado para a área da olanzapina.

	Coeficientes	Erro padrão	t(3)	p	- 95% Limite de confiança	+95% Limite de confiança
Média	399935	10658,98	37,52	0,000000	372535	427335
(1) CUR (L)	-11000	7537,04	-1,46	0,204241	-30375	8374
CUR (Q)	-10738	6923,21	-1,55	0,181609	-28534	7059
(3) GS1 (L)	2746	7537,04	0,36	0,730470	-16628	22121
GS1 (Q)	-32690	6923,21	-4,72	0,005234	-50486	-14893
(4) GS2 (L)	-2042	7537,04	-0,27	0,797311	-21416	17333
13	8105	9230,95	0,88	0,420114	-15624	31834
14	7507	9230,95	0,81	0,453056	-16222	31236
34	-13625	9230,95	-1,48	0,199971	-37354	10104

Na Figura 22, estão mostradas as curvas de níveis obtidas a partir do modelo construído. Podemos inferir que no nível mais baixo tanto do *curtain gás* (CUR) quanto do *gás secante* (GS2), aliado ao nível central do gás nebulizador é obtida a resposta máxima no intervalo estudo.

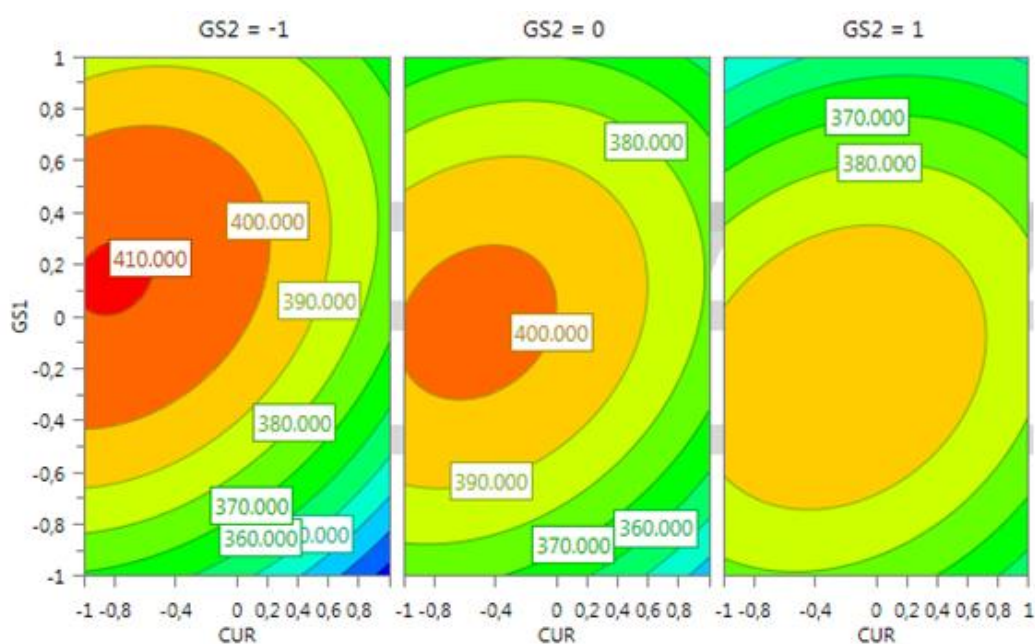


Figura 22: Curvas de níveis obtidas para a área da olanzapina.

Os valores definidos para CUR, IS, TEM, GS1, GS2 foram 21; 2230; 750; 35,5 e 40,2, respectivamente.

5.5 Reavaliação do *declustering potencial*

Devido às novas condições de ionização obtidas através da estratégia proposta neste estudo, fez-se necessária a reavaliação da diferença de potencial envolvida na trajetória dos íons a serem detectados pelo espectrômetro de massas. Entretanto, verificou-se que não houve uma alteração significativa nos valores encontrados como mostrado na Figura 23.

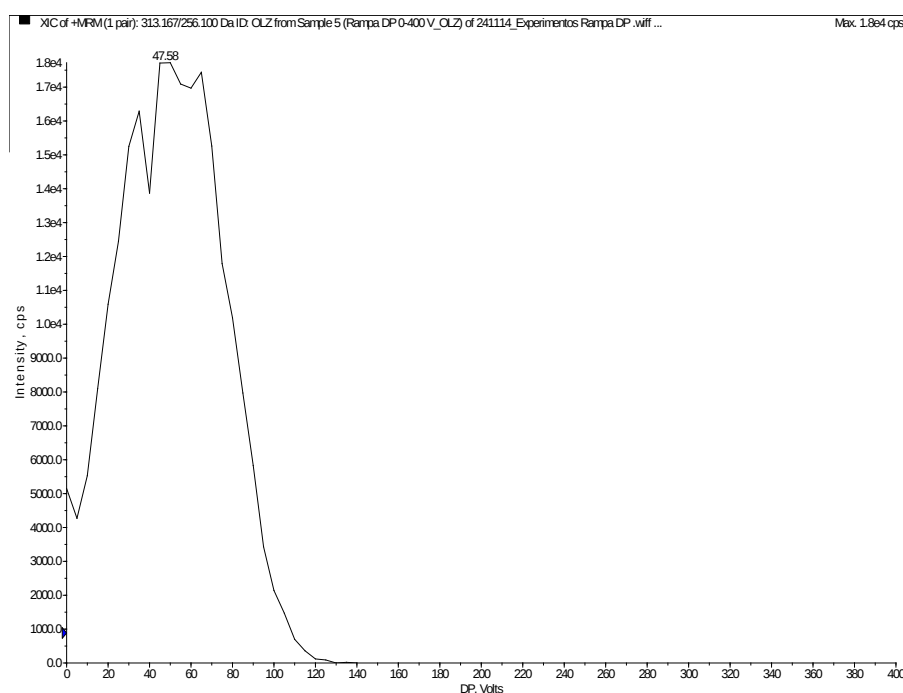


Figura 23: Representação gráfica da variação de intensidade da olanzapina (cps) em função do declustering potencial.

5.6 Comparação entre os métodos desenvolvidos

Após a conclusão da etapa de otimização dos parâmetros da fonte de ionização, foi realizado um experimento visando comparar a otimização (multivariada) proposta neste estudo com a (univariada) realizada pela abordagem tradicional. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 30.

Tabela 30: Resultados da comparação entre os métodos de otimização.

	OLZ		QTP	
	Otimização Univariada	Otimização multivariada	Otimização univariada	Otimização multivariada
1	257779	389219	155755	253769
2	261747	397476	162442	243273
3	259668	379318	166548	245204
Média	259731	388671	161582	247415
DP	1984	9091	5447	5586
DPR (%)	0,76	2,34	3,37	2,26

Um teste-t pareado foi realizado e verificou-se que, no nível de 95% de confiança, houve diferença significativa entre as médias das áreas obtidas através das duas diferentes abordagens, tanto para olanzapina ($p < 0,0014$) quanto para a quetiapina ($p < 0,0050$).

A abordagem multivariada mostrou-se mais eficiente na obtenção de um método com mais sensibilidade para ambos os analitos. No caso da olanzapina, houve um acréscimo de 50% no valor médio da área, já para a quetiapina, houve um incremento de 53%. Essa diferença pode ser constatada na representação gráfica *boxplot* mostrada na Figura 24.

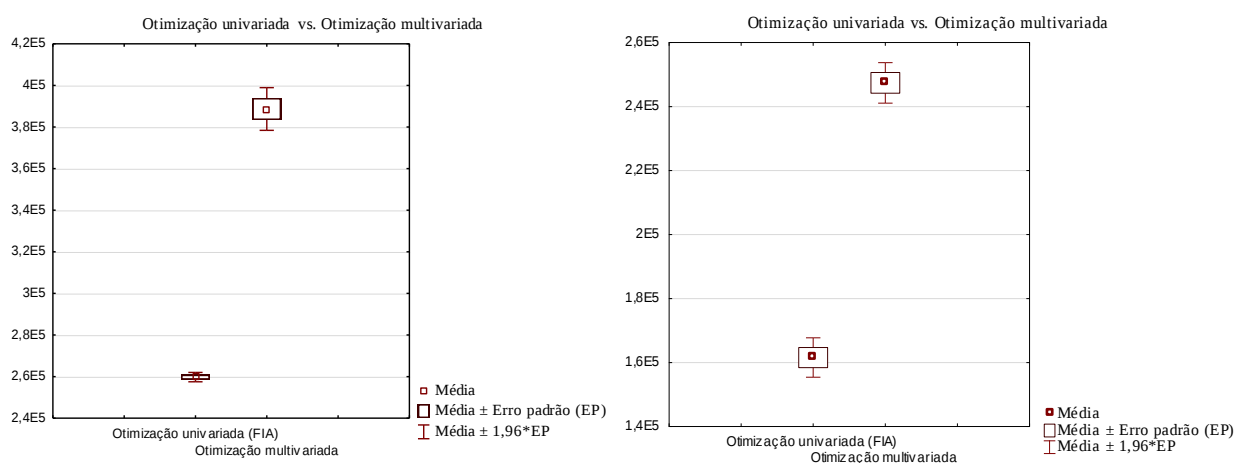


Figura 24: Representação *boxplot* da comparação das áreas obtidas através das abordagens univariada e multivariada para olanzapina (A) e quetiapina (B).

5.7 Desenvolvimento do processo de extração

Um experimento fatorial 3^2 foi realizado para avaliar a influencia do pH e do tipo de solvente utilizado para extrair os fármacos da matriz biológica sobre o efeito matriz (EM),

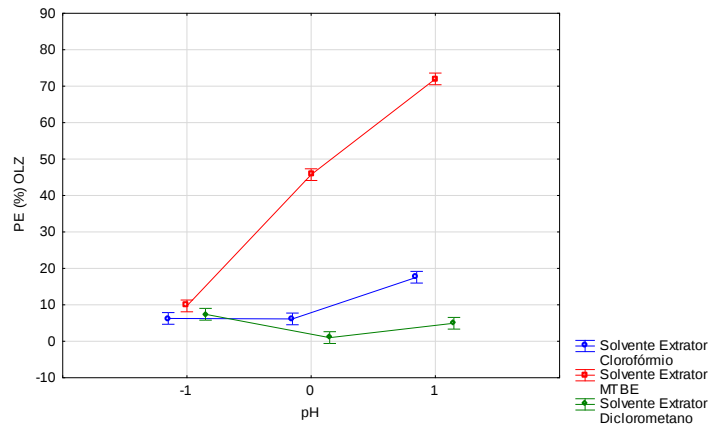
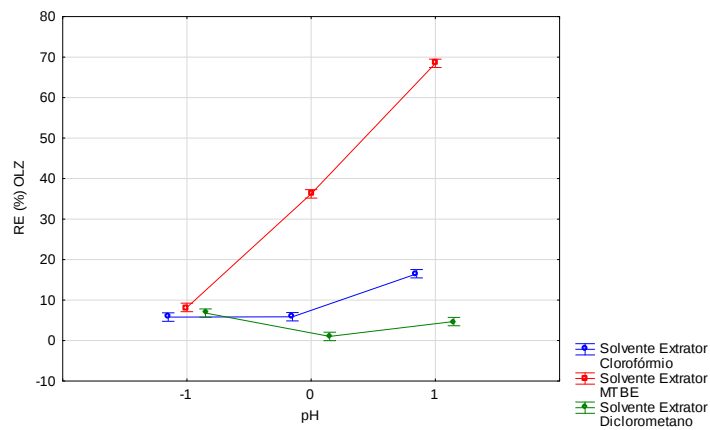
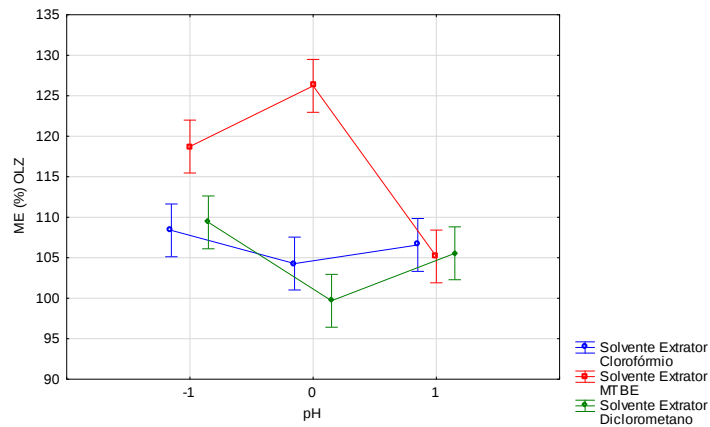
recuperação (RE) e eficiência de processo (EP) de cada fármaco. Os resultados estão mostrados na Tabela 31.

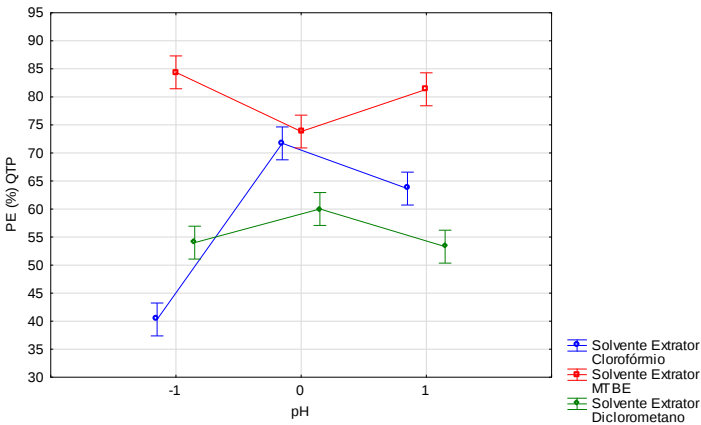
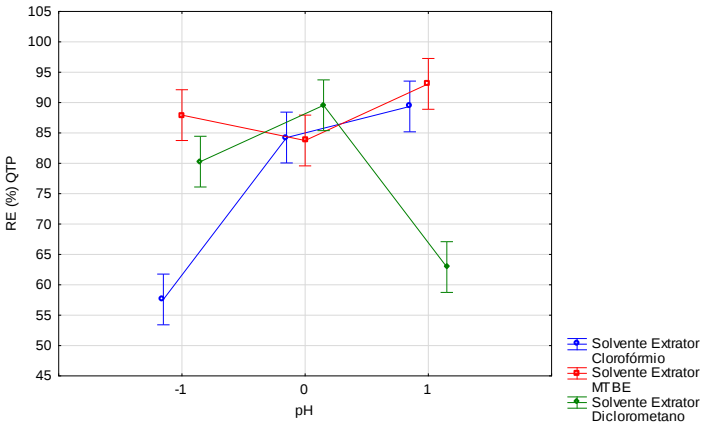
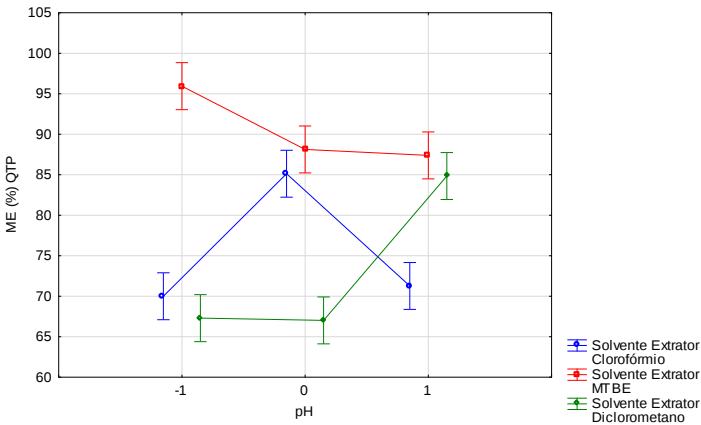
Tabela 31: Resultados do planejamento 3^2 para desenvolvimento do processo de extração.

Réplica	Solvente Extrator	pH	EM (%)			RE (%)			EP(%)		
			OLZ	QTP	VLX	OLZ	QTP	VLX	OLZ	QTP	VLX
1	MTBE	-1	118,18	96,80	110,82	8,11	89,77	62,75	9,59	86,90	69,55
2	MTBE	-1	119,29	95,07	109,90	8,27	86,10	64,07	9,86	81,85	70,41
1	MTBE	0	127,08	88,59	99,85	36,26	84,18	83,66	46,08	74,57	83,54
2	MTBE	0	125,37	87,67	101,13	36,20	83,34	83,56	45,38	73,07	84,50
1	MTBE	1	106,35	87,18	98,49	69,38	90,77	97,42	73,79	79,13	95,95
2	MTBE	1	103,97	87,61	98,61	67,54	95,40	99,11	70,22	83,58	97,73
1	Diclorometano	-1	111,73	67,74	94,51	6,86	78,44	61,69	7,66	53,14	58,30
2	Diclorometano	-1	107,01	66,85	96,74	6,72	82,11	64,22	7,19	54,89	62,13
1	Diclorometano	0	98,21	68,27	84,75	1,10	88,58	79,65	1,08	60,47	67,50
2	Diclorometano	0	101,16	65,76	85,69	0,95	90,55	82,88	0,96	59,55	71,02
1	Diclorometano	1	106,35	87,52	103,30	4,38	59,36	76,31	4,66	51,95	78,84
2	Diclorometano	1	104,75	82,17	99,28	5,01	66,49	76,77	5,25	54,63	76,22
1	Clorofórmio	-1	110,18	70,82	89,91	5,47	57,80	53,88	6,02	40,94	48,45
2	Clorofórmio	-1	106,58	69,18	85,05	6,13	57,37	55,08	6,54	39,69	46,85
1	Clorofórmio	0	106,42	85,29	97,18	6,22	83,99	99,03	6,62	71,64	96,23
2	Clorofórmio	0	102,13	84,96	95,77	5,54	84,50	106,66	5,66	71,80	102,15
1	Clorofórmio	1	106,61	69,23	88,73	15,66	91,51	90,55	16,70	63,36	80,34
2	Clorofórmio	1	106,55	73,31	94,76	17,33	87,21	90,36	18,47	63,93	85,63

EM: efeito matriz; RE: recuperação; EP: eficiência do processo de extração.

Uma análise de variância foi realizada para cada resposta e constatou-se que os efeitos dos fatores estudados isoladamente, bem como a interação entre eles são significativos no nível de 95% de confiança. De modo a facilitar a comparação dos dados obtidos, foram elaborados os gráficos mostrados na Figura 25.





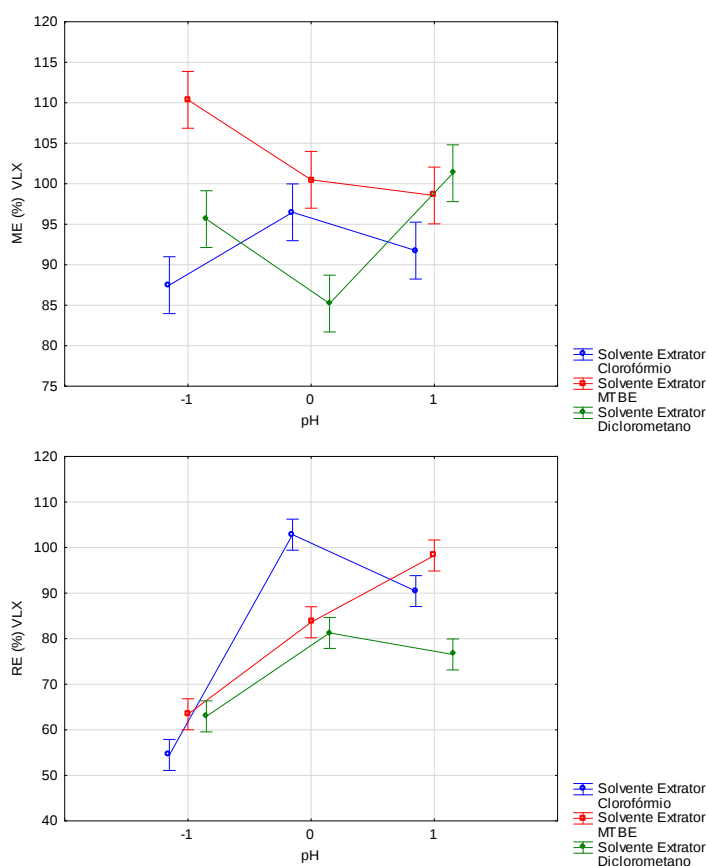


Figura 25: Variação das respostas com os níveis de pH e tipo de solvente. As barras verticais denotam intervalos de confiança de 95%.

Analisando-se os gráficos mostrados na Figura 25, pode-se notar que em todos eles as linhas não são paralelas, indicando, assim, a existência significativa de interação entre os fatores. Além disso, constata-se que a utilização de MTBE como solvente extrator aliado a um pH alcalino, produz um menor efeito matriz e uma maior recuperação e eficiência do processo para todos os fármacos. Isso se deve ao fato de que, em meio alcalino, as moléculas encontram-se majoritariamente na sua forma não ionizada, em virtude de serem bases. Ademais, dentre os solventes estudados, o MTBE é o que apresenta a menor polaridade, facilitando a partição das moléculas não ionizadas dos compostos analisados.

O método bioanalítico modelo desenvolvido nesta pesquisa apresentou a separação cromatográfica dos picos da olanzapina, quetiapina e venlafaxina, e um incremento médio de área para os analitos de aproximadamente 50% em comparação com a metodologia de otimização usualmente empregada na rotina de laboratórios que utilizam a técnica de cromatografia líquida de alta eficiente acoplada à espectrometria de massas em série. Além disso, foi desenvolvido um método de extração com uma eficiência de processo superior a 70% para todos os fármacos.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados expostos nesta dissertação é possível concluir que:

O emprego de uma estratégia com várias etapas e diferentes critérios de otimização — auxiliada por ferramentas estatísticas tais como o planejamento de experimentos, modelagem empírica e construção de superfícies de resposta—, oferece uma maneira simples e eficaz de desenvolver métodos bioanalíticos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série.

Em termos de seletividade, foi demonstrado que a partir de poucos experimentos é possível se obter a total separação dos compostos analisados.

Em termos de sensibilidade, a utilização de uma metodologia de otimização multivariada, tal como a proposta neste estudo, é bastante superior às técnicas de otimização univariada, usualmente empregadas na rotina de laboratórios que utilizam a técnica de CLAE-EM/EM.

Foi demonstrado que através da aplicação de técnicas estatísticas simples, e com relativamente poucos experimentos, pode-se desenvolver ótimos métodos de extração.

O método modelo desenvolvido oferece, em comparação com outros métodos reportados na literatura, uma grande melhora na retenção da olanzapina.

REFERÊNCIAS

BARRETT, B.; HOLCAPEK M.; HUCLOVA, J.; BOREK-DOHALSKY, V.; FEJT, P.; NEMEC B.; JELINEK, I. **Validated HPLC–MS/MS method for determination of quetiapine in human plasma.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis; 44: 498–505, 2007.

BEDOR, D. C. G. **Desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos para dosagem de antimicrobianos em plasma humano.** Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

BEDOR, N.C.T.C.; BEDOR, D.C.G.; SOUSA, C. E. M.; BIONIFACIO, F. N.; BRANCO, D. M. C.; LEAL,L.B.; SANTANA, D. P. **The development and validation of a method for the determination of olanzapine in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study.** Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology, v. 42, p. 305-313, 2015.

BOOTH, B. P. **Welcome to Bioanalysis.** Bioanalysis, v. 1, n. 1, p. 1–2, 2009.

BOX, G. E. P.; DRAPER, N. R. **Response Surfaces , Mixtures , and Ridge Analyses.** 2nd. ed. Wiley-Interscience, 2007.

BRASIL, **Empresa Eli Lilly.** Disponível em: < http://www.lilly.com.br/inserts/patients/bula_zyprexazydispacienteCDS24set12.pdf/>, Acesso em fevereiro de 2014.

BRASIL. **Ministério da Saúde.** PORTARIA Nº 978, DE 16 DE MAIO DE 2008.

BRASIL. **Ministério da Saúde.** PORTARIA Nº 2.981, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2009.

CARDOSO, F.F.S.S.; ABREU, F.C.; MUNDIN, I.M.; SOUZA, W.C.; CAÇULA, A.C.C.S.M.; MORAIS, D.C.; LIMA, L.G. **Comparação da bioequivalência entre duas formulações de olanzapina 2,5 mg comprimidos em voluntários sadios após a administração de dose única.** Revista Brasileira de Medicina, v.69, n.7, p.1-8, 2012.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. **Revisão.** Química Nova, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008.

DAVIS PC, WONG J, GEFVERT O. **Analysis and pharmacokinetics of quetiapine and two metabolites in human plasma using reversed-phase HPLC with ultraviolet and electrochemical detection.** Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis. v20: 271–82, 1999.

DE HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry.** 3rd. ed. v. 17p. 502, 2007.

DIXIT, Mudit; KINI, Ashwini Gopalkrishna; KULKARNI, Parthasarathi Keshavarao. **Enhancing the aqueous solubility and dissolution of olanzapine using freeze-drying.** Braz. J. Pharm. Sci., São Paulo , v. 47, n. 4, Dec. 2011.

EKMAN, R. et al. **Mass Spectrometry - Instrumentation, Interpretation and Applications.** Wiley-Interscience, p. 390. 2009.

GUNASEKARA NS, SPENCER CM. **Quetiapine: a review of its use in schizophrenia.** CNS Drugs; v 9: 325-340, 1998.

HILL, H. **Development of bioanalysis : a short history.** Bioanalysis, v. 1, n. 1, p. 3–7, 2009.

FRENCH, D.; SMOLLIN, C.; RUAN, W.; WONG, A.; DRASNER K. **Partition constant and volume of distribution as predictors of clinical efficacy of lipid rescue for toxicological emergencies.** Clinical toxicology, v. 49, n. 9, p. 801-809, 2011.

FRAGA, C.A.M.; MENEGATTI, R.; BARREIRO,E.J.; NEVES, G.;BETTI, A.H.; KLIEMANN, M.; RATES, S.M.K.; TASSO, L.; CONRADO, D.J.; COSTA, T.D.; OLIVEIRA, V.; NOËL, F. **Descoberta de novos protótipos N-fenilpiperazínicos heteroarilazólicos candidatos a fármacos antipsicóticos atípicos.** Revista Virtual de Química, v. 2, n.1, p.28-37, 2010.

HONEYWELL, R. et al. **The determination of gemcitabine and 2'-deoxycytidine in human plasma and tissue by APCI tandem mass spectrometry.** Journal of chromatography B, v. 847, n. 2, p. 142–52, 1 mar. 2007.

HUBERT, P., CECCATO, P.C., TOUSSAINT, B., CROMMEN, J. **Préparation des échantillons d'origine biologique préalable à leur analyse chromatographique.** STP Pharma Pratiques, v.9 n.2, 160–18, 1999.

KEBARLE, P.; TANG, L. **From ions in solution to ions in the Mechanism of Electrospray Mass Spectrometry report.** Analytical Chemistry, v. 65, n. 22, p. 972–986, 1993.

KOSTIĆ, N. et al. **Stepwise optimization approach for improving LC-MS/MS analysis of zwitterionic antiepileptic drugs with implementation of experimental design.** Journal of mass spectrometry, v. 48, n. 7, p. 875–84, jul. 2013.

KOZIOLEK, M., GARBACZ, G., NEUMANN, M., & WEITSCHIES, W. **Simulating the postprandial stomach: biorelevant test methods for the estimation of intragastric drug dissolution.** Molecular pharmaceutics, 10(6), 2211-2221, 2013.

MAURI M. C, Volonteri L.S., Colasanti A.,Fiorentini A., Gaspari I.F., Bareggi S.R. **Clinical pharmacokinetics of atypical antipsychotics.** Clinical pharmacokinetics, v. 46, n. 5, p. 359-388, 2007.

MAJORS, R. E. **An overview of sample preparation.** LC GC-Mag. Sep. Sci., Veneta, v. 9, p. 16, 1991.

MCCALLEY, D. V. **Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds?** Journal of chromatography. A, v. 1171, n. 1-2, p. 46–55, 9 nov. 2007.

MCCALLEY, D. V. **The challenges of the analysis of basic compounds by high performance liquid chromatography: some possible approaches for improved separations.** Journal of chromatography. A, v. 1217, n. 6, p. 858–80, 5 fev. 2010.

MCMMASTER, M. C. **LC / MS A Practical User ' s Guide**. Wiley-Interscience, p. 168, 2005.

MENEZHINI, L. Z. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para bromidrato de darifenacina**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

MOBERG, M.; BERGQUIST, J.; BYLUND, D. **A generic stepwise optimization strategy for liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry methods**. *Journal of mass spectrometry*, v. 41, n. October, p. 1334–1345, 2006.

MOBERG, M. **Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry**. Uppsala Universitet, 2006.

MONTGOMERY, C. D. **Design and Analysis of Experiments**. 5 ed. John Wiley & Sons, Inc., p. 699, 2001.

MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. DO. **Espectrometria de massas com ionização por "electrospray" aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas**. *Química Nova*, v. 26, n. 4, p. 556–563, 2003.

MOURA, J.R. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica aplicável ao desenvolvimento farmacotécnico de comprimidos de olanzapina**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás, 48p, 2009.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos?** 4 ed. Booman, 2010.

MOBERG, M. **Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry**. p. 66, 2006.

ORLANDO, R. M., CORDEIRO, D. D., MATHIAS, A. E. B., REZENDE, K. R., GIL, E. D. S. **Pré-tratamento de amostras**. *Universidade de Campinas*, 2009.

PAN R, KUO BP, PAO L. Validated LC–MS–MS Method for the Determination of Quetiapine in Human Plasma: Application to a Pharmacokinetic Study. **Journal of Chromatographic Science**; v. 50 : 277–82, 2012.

PEREIRA, S.; BICALHO, B.; LILLA, S. Assuntos Gerais. **Química Nova**, v. 28, p. 107–111, 2005.

PUBCHEM, N. I. S. T. Olanzapine. **NIST PubChem (Public Chemical) database**, Acesso **Julho de 2014**. accessed Jul, 2014.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. **Methods of extraction and/or concentration of compounds found in biological fluids for subsequent chromatographic determination**. *Quím. Nova*, v. 24, p. 68–76, 2001.

QUEIROZ, M.E.C.; LANÇAS, F.M. **Analysis of drugs in biological samples: Automated "In- tube" solid-phase microextraction and High performance liquid chromatography**. *Química Nova*, v.28, n.5, p.880–886, 2005.

RAFFAELLI, A.; SABA, A. **Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry.** Mass spectrometry reviews, v. 22, n. 5, p. 318–31, 2003.

RÊGO, J.F.; MOURA, J.I.; MOITA, G.C. **Determinação de olanzapina em formulações farmacêuticas por espectrofotometria: desenvolvimento e validação.** Química Nova, v.33, n.2, p.471-477, 2010.

SAAVEDRA, I.; ALARCÓN, A.; BUSTAMANTE, R.; CÁCERES, D.; LETELIER, M.E.; QUIÑONES, L. **Biodisponibilidad relativa de una formulacion oral de olanzapina del mercado nacional, respecto a la formulacion de referencia internacional.** Revista de Farmacologia Chile, v.2, n.1, p.1-7, 2009.

SMALL JG, HIRSCH SR, ARVANITIS LA, MILLER BG, LINK CG. **“Quetiapine in patients with schizophre ni, A high-and low-dose double-blind comparison with placebo” Seroquel study group,** Arch Gen Psychiatry, 54(6): 549-557, 1997.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid.** Third Edition. 3rd. ed. John Wiley & Sons, p. 957, 2010.

SONG, D.; WANG, J. **Modified resolution factor for asymmetrical peaks in chromatographic separation.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 32, n. 6, p. 1105–1112, ago. 2003.

SUDHA, T.; SHANMUGASUNDRAM, P. **Simultaneous Optimization of the Resolution and Analysis time in RP- HPLC Method for Abacavir and Lamivudine using Derringer ' s desirability function.** International Journal of PharmTech Research, v. 6, n. 3, p. 040–1048, 2014.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial.** Química Nova, v. 29, n. 2, p. 338–350, 2006.

VAN DER ZWAAL, E.M.; LUIJENDIJK, M.C.M.; EVERS, S.S.; LA FLEUR, S.E.; ADAN, R.A.H. **Olanzapine affects locomotor activity and meal size in male rats.** Pharmacology Biochemistry and Behavior, n. 97, p. 130-137, 2010.

VAN EECKHAUT, A. et al. **Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects.** Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, v. 877, n. 23, p. 2198–207, 1 ago. 2009.

VENKATA, R. N. **Clozapine/olanzapine/quetiapine overdose.** Reactions Weekly,1453, 25. 2013.

VÖLGYI, G., BAKA, E., BOX, K. J., COMER, J. E., & TAKÁCS-NOVÁK, K. **Study of pH-dependent solubility of organic bases. Revisit of Henderson-Hasselbalch relationship.** Analytica chimica acta, 673(1), 40-46, 2010.

XU, R. N. et al. **Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS.** Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, v. 44, n. 2, p. 342–55, 2007.