

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

**Estudo comparativo de métodos de extração para determinação de fluazuron
em plasma bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em
ultravioleta**

Thais Paes Ferreira

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Estudo comparativo de métodos de extração para determinação de fluazuron em plasma bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em ultravioleta

THAIS PAES FERREIRA

Sob Orientação da Professora

Yara Peluso Cid

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica

Seropédica, RJ

Maiο, 2016

543.8

F368e

T

Ferreira, Thais Paes, 1987-

Estudo comparativo de métodos de extração para determinação de fluazuron em plasma bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em ultravioleta / Thais Paes Ferreira - 2016. 64 f.: il.

Orientador: Yara Peluso Cid.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Química.

Bibliografia: f. 59-64.

1. Extração (Química) - Teses. 2. Análise cromatográfica - Teses. 3. Cromatografia a líquido de alta eficiência - Teses. 4. Benzoilfenil uréias - Teses. 5. Química - Teses. I. Cid, Yara Peluso, 1982-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Química. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

THAIS PAES FERREIRA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau Mestre em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração Química Analítica.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 11 /05 / 2016

Prof. Dra. Yara Peluso Cid, DEQUIM-UFRRJ
(Orientadora)

Prof. Dra. Monica Costa Padilha, IQ-UFRRJ

Prof. Dra. Vanessa Gomes Kelly Almeida, DEQUIM-UFRRJ

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que está sempre presente em minha vida me iluminando e me guiando.

A minha amada avó Lourdes que sem a ajuda dela eu jamais teria chegado até aqui.

Aos meus amados pais, Iracema e Jorge, pelo apoio, paciência e amor incondicional em todos os momentos.

E a minha irmã Daniele por toda paciência e apoio e ao meu irmão Gabriel, meu xodó e orgulho.

AGRADECIMENTOS

Grande é minha lista de agradecimentos (o que me torna uma pessoa de sorte!).

Meu primeiro agradecimento é para a minha grande orientadora Yara Peluso Cid, por ter acreditado no meu trabalho e por ter me orientado com paciência, dedicação e muito amor desde a minha graduação até aqui. E principalmente por ter batalhado pela criação do programa de pós-graduação em química analítica, sem o seu esforço não seria possível essa conquista

É um imenso privilégio ser sua aluna, não tenho palavras suficientes para agradecer a sua intensa participação na minha vida científica, profissional e particular. Obrigado por tudo! Gostaria de agradecer a minha companheira de trabalho, Viviane Magalhães pela sua grande contribuição para a minha formação profissional e por toda ajuda e incentivo dado até aqui. Um agradecimento ao departamento de Parasitologia que aprovou a minha liberação para realização do mestrado, e em especial ao prof. Fábio Scott que foi a peça fundamental para ao meu retorno ao LQEPV.

Agradeço a toda a equipe do LQEPV, em especial aos estagiários Isabela Lima, Isabela Hastenreiter, Valéria, Marcos, Pedro, Gabriela, Liliane, Leandra, Augusto que não permitiram que eu surtasse durante esse período, me proporcionando alegria e ajuda nos momentos de ausência. Mas, em especial, gostaria de agradecer duas pessoas que possuem um imenso valor na minha vida, Rodrigo de Oliveira, obrigado por todos os abraços sufocantes, cheios de paz e ternura que você me deu nos momentos mais difíceis na minha trajetória dentro desse laboratório; e a Fernanda Santos, que enxugou algumas lágrimas durante esse período e foi a principal companhia nos momentos de descontração.

Frederico Goytacazes meu companheiro de estudo durante o mestrado, obrigado por tudo! As minhas grandes amigas que estão sempre me incentivando e me fazem sentir uma das pessoas mais feliz desse mundo, Lilian, Tarcilla, Thais e Liliane, muito obrigado por todo o apoio e compreensão do meu afastamento durante esse período.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado!

Melhor viver meu bem, pois há um lugar em que o sol brilha por você.
Chorar, sorrir também e depois dançar....
(Marcelo Jeneci)

RESUMO

FERREIRA, Thais Paes. **Estudo comparativo de métodos de extração para determinação de fluazuron em plasma bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em ultravioleta**. 2016. 64p Dissertação (Mestrado em Química,- área de concentração em Química Analítica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Fluazuron é um inibidor do crescimento da classebenzoilfeniluréia, sendo comercializado para o controle de carrapatos do gado. Embora a classe de reguladores de crescimento sejam amplamente estudada, o número de artigos que descrevem os métodos analíticos para a determinação do fluazuron em amostras de plasma é escasso. O desenvolvimento de um método analítico simples e rápido para quantificar fluazuron em plasma bovino por CLAE-UV permite a avaliação do perfil plasmático do fármaco e pode ser aplicado na análise de biodisponibilidade de formulações contendo fluazuron. Nos últimos anos, tem acontecido um avanço tecnológico para a instrumentação cromatográfica, proporcionando métodos rápidos, eficazes e sensíveis, mas a etapa de pré-tratamento da amostra torna-se o fator limitante neste processo. Novos métodos de extração têm sido desenvolvidos, no entanto, muitas das vezes são métodos complexos, caros e não tão sofisticados para matrizes complexas como o plasma. O objetivo deste estudo foi um estudo comparativo de três métodos de extração: extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida (EFS) e dispersão de matriz em fase sólida (DMFS). Uma mistura de amostras de plasma foi utilizada como material biológico, uma parte como amostra bruta e outra parcialmente enriquecida com concentrações de fluazuron. Para cada método de extração (exceto DMFS) foram analisados diversos solventes (acetato de etila, diclorometano, éter dietílico, hexano e acetonitrila), a fim de avaliar o melhor solvente extrator. Após as extrações, as amostras foram concentradas e analisadas por CLAE/UV. A separação cromatográfica foi obtida na coluna Kromasil C18 precedida de pré-coluna de fase química correspondente, com fase móvel de acetonitrila: água (80:20, v/v) a um fluxo de 1,0 mL /min. A análise comparativa dos procedimentos de extração foi baseada na seletividade, precisão e exatidão do método. Os resultados mostraram que a precisão ELL não apresentou exatidão (<80 e > 120%) e precisão (CV > 15%) com nenhum dos solventes analisados. O método EFS mostrou boa exatidão (80-120%) e precisão (CV <15%) para o acetato de etila, diclorometano e éter dietílico. O método de DMFS utilizando o solvente acetato de etila mostrou boa exatidão e precisão. No entanto, a EFS também permite um menor consumo de solventes e um tempo curto de análise; A validação do método analítico mostrou linearidade, seletividade, precisão, exatidão e, ausência de efeitos de matriz e residual, demonstrando-se adequado para análises de rotina; Este método mostrou-se uma ferramenta de investigação importante na análise de concentração plasmática em bovinos. Fluazuron administrado por via tópica em bovinos atingiu a circulação sistêmica ($C_{max} = 62,8 \text{ ng /ml}$) e foi absorvido ($T_{máx} = 48 \text{ Hs}$), se mantendo quantificável em níveis plasmáticos por até 14 dias após o tratamento com uma dosagem de 2,5 mg / kg.

Palavras-chave: Amostras biológicas, preparo de amostras, benzoilfeniluréias.

ABSTRACT

FERREIRA, Thais Paes. **Comparison of extraction methods for determining fluazuron in bovine plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection.** 2016. 64p Thesis (Master in Chemistry - area of concentration in Analytical Chemistry). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Key-Words: Biological samples, Sample preparation, Fluazuron.

Fluazuron is a benzoylphenylurea acarine growth inhibitor that is marketed for the control of cattle tick. Although the growth regulators are widely studied class, the number of papers describing analytical methods for determining the fluazuron in plasma samples is reduced. The development of a simple and fast analytical method for quantifying fluazuron in bovine plasma by HPLC-UV enables the evaluation of drug plasma profile and can be applied on bioavailability analysis of formulations containing fluazuron. In recent years there has been a technological breakthrough for chromatographic instrumentation, providing rapid, robust and sensitive methods, but the pretreatment of the sample stage becomes the limiting factor in this process. New extraction methods have been developed, however are often complex, expensive methods and are not as sophisticated to handle complex matrices, such as plasma. The aim of this study was a comparative study of three extraction methods: LLE, SPE and matrix solid phase dispersion (MSPD). Pooled plasma samples were used as biological material, partly as raw samples and partly spiked with concentrations of fluazuron. For each extraction method (with exception of DMFS) was conducted using various solvents (ethyl acetate, dichloromethane, diethyl ether, hexane and acetonitrile) in order to evaluate the best extractor solvent. After the extractions the samples were concentrated and analyzed by HPLC/UV. The chromatographic separation was achieved on Kromasil C18 column preceded by guard column of matching chemistry, with mobile phase of acetonitrile: water (80:20, v/v) at flow rate of 1.0 mL/min. The comparative analysis of the extraction procedures was based on selectivity, precision and accuracy of the method. Results showed that LLE not presented accuracy (< 80 and >120%) and precision (CV > 15%) with any solvent tested. SPE method showed good accuracy (80-120%) and precision (CV < 15%) for ethyl acetate, dichloromethane and diethyl ether. MSPD method using ethyl acetate solvent showed good accuracy and precision. However, SPE also allows a lower solvent consumption and shorter analysis time. The validation of the analytical method showed linearity, selectivity, precision, accuracy and, absence matrix effects and residual, thus proving it as suitable for routine analysis; This method showed to be an important investigative tool in the analysis of fluazuron plasma concentration in cattle. Fluazuron topical administration in bovine reached the systemic circulation ($C_{max}=62,8$ ng/mL), was absorbed ($t_{max}=48$ hs), while maintaining quantifiable blood plasma levels for up to 14 days after the treatment with a 2,5 mg/Kg dosage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do tempo de análise(ADAPTADO GUIDELINES, 2016).....	5
Figura 2 - Etapas da extração em fase sólida (CALDAS et al., 2011).....	12
Figura 3 - Etapas do processo de DMFS (BARKER, 2007)	14
Figura 4 - Etapas da técnica de MELLD (CALDAS et al., 2011).....	18
Figura 5 - Estrutura química Fluazuron (Pubchem,2016).....	21
Figura 6 - Gráfico de efeito da intensidade de agitação na eficiência de extração na Extração Líquido Líquido.....	41
Figura 7 - Resultados de recuperação e precisão absoluta e relativa para os quatro solventes avaliados na Extração Líquido Líquido.....	42
Figura 8- Resultados de exatidão e precisão absoluta e relativa para os cinco solventes avaliados na Extração em Fase Sólida.....	43
Figura 9 - Resultados de recuperação e precisão de acordo com a quantidade de florisil utilizada na etapa de <i>clean-up</i> para DMFS.	45
Figura 10 - Cromatograma comparativo dos três métodos avaliados e do padrão com concentração idêntica das amostras:dispersão de matriz em fase sólida, extração em fase sólida e extração líquido-líquido.....	47
Figura 11 – Cromatograma das amostras branco (plasma isento de fluazuron e padrão interno) utilizadas para avaliar o parâmetro seletividade.....	49
Figura 12 – Cromatogramas de amostra branco anterior a injeção da amostra de LSQ (A) ,amostra de LSQ (B) e três injeções subsequentes da amostra branco (C).	50
Figura 13 – Curvas de calibração analítica obtidas nos três dias de análise.	53
Figura 14 – Curva de concentração plasmática <i>versus</i> tempo do fluazuron após administração de formulação de fluazuron tópica em bovinos.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicações de diversas técnicas de extração de fármacos em plasma utilizando a cromatografia líquida.....	6
Tabela 2 - Propriedades Físico-Químicas do fluazuron (NCBI, 2016).....	22
Tabela 3 – Preparação das amostras para avaliação efeito matriz.....	33
Tabela 4 – Preparo de amostras para curva analítica, precisão e exatidão.....	34
Tabela 5 – Propriedades físico-químicas dos solventes orgânicos (NCBI, 2016).....	40
Tabela 6 – Resultados de recuperação e precisão (CV) utilizando a água na etapa de <i>clean-up</i> do extrato na Dispersão de Matriz em Fase Sólida.	45
Tabela 7 - Resultados de recuperação e precisão (CV) para avaliação de três proporções de amostra: adsorvente na DMFS.	46
Tabela 8 - Porcentagem em relação a área do LIQ para fluazuron e em relação a área do PI de interferentes no tempo de retenção de cada um dos analitos.....	49
Tabela 9- Coeficientes de Variação dos FMNs relativos as amostras de CQB e CQA.	51
Tabela 10 - Avaliação da homogeneidade das variâncias dos resíduos para a curva de calibração dos três dias conforme teste F de Snecodor.....	52
Tabela 11 – Valores de concentração experimental e desvio de cada ponto da curva de calibração após a ponderação dos dados.	53
Tabela 12 – Equações de regressão linear ponderada das curvas de calibração do fluazuron.	54
Tabela 13 – Resultados de precisão e exatidão intra-dia e inter -dias em três dias de análise.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN - Acetonitrila
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C₁₈ - Sílica modificada com hidrocarboneto linear C18
C₈ - Sílica modificada com hidrocarboneto linear C8
C_F - Concentração final
CG - Cromatografia gasosa
CG-MS - Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas
CL - Cromatografia líquida
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE/EC - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector eletroquímico
CL-FL - Cromatografia Líquida acoplada ao detector de fluorescência
CL-MS - Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas
CL-MS/MS - Cromatografia Líquida acoplada à massas sequencial
CL-UV - Cromatografia Líquida acoplada ao detector ultravioleta
CME - Concentração média experimental
CQA - Controle de qualidade de alta concentração
CQB - Controle de qualidade de baixa concentração
CQD - Controle de qualidade de diluição
CQM - Controle de qualidade de média concentração
C_{ST} - Concentração da solução de trabalho
DLLME - Microextração Líquido-Líquido Dispersiva
DMFS - Dispersão de matriz em fase sólida
DP - Desvio padrão
DPR - Desvio padrão relativo
EDVB - Polímeros de estireno-divinilbenzeno
EFS - Extração em fase sólida
ELL - Extração líquido-líquido

ELL - Extração Líquido-Líquido
ELP - Extração líquido pressurizada
EPR - Erro padrão relativo
ESBA - Extração sortiva em barra de agitação
FDA - Food and Drug Administration
FLU - Fluazuron
FMN - Fator matriz normalizada
LIQ - Limite inferior de quantificação
Log P - Coeficiente de partição
LQEPV - Laboratório de quimioterapia experimental em parasitologia veterinária
LSQ - Limite superior de quantificação
MAPA - Ministério da agricultura pecuária brasileira e abastecimento
MELLD - Microextração líquido-líquido dispersiva
MESE - Microextração em sorvente empacotado
MLLD - Microextração líquido-líquido dispersiva
m-PMI - Polímero de impressão molecular magnético
PI - Padrão interno
pKa - Constante de acidez
PP - Precipitação de proteínas
RDC - Resolução de diretoria colegiada
RLP - Regressão linear ponderada
SLE - Extração líquida suportada
UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1	Técnicas Analíticas	3
2.2	Métodos de Extração.....	4
2.3	Princípios Fundamentais do Preparo de Amostras	6
2.4	Extração Líquido-Líquido.....	10
2.5	Extração em Fase Sólida	11
2.5.1	Dispersão de matriz em fase sólida.....	14
2.5.2	Microextração líquido-líquido dispersiva	17
2.6	Fluazuron	20
2.7	Biodisponibilidade e Farmacocinética	22
2.7.1	Farmacocinética do fluazuron	24
2.8	Validação.....	25
2.8.1	Seletividade	26
2.8.2	Efeito residual	26
2.8.3	Efeito matriz.....	26
2.8.4	Limite de quantificação.....	27
2.8.5	Limite de detecção	27
2.8.6	Curva de calibração.....	28
2.8.7	Precisão	29
2.8.8	Exatidão.....	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	Material	31
3.1.1	Equipamentos e acessórios.....	31
3.1.2	Reagentes e padrões	32
3.2	Métodos.....	32
3.2.1	Localização da experimentação	32
3.2.2	Preparo de soluções e amostra	32
3.2.3	Métodos de extração	34
3.2.3.1	Extração líquido-líquido	34

3.3	Método Analítico	37
3.3.1	Condições cromatográficas	37
3.4	Validação do Método de Extração de Fase Sólida.....	37
3.4.1	Seletividade	37
3.4.2	Efeito residual	37
3.4.3	Efeito matriz.....	37
3.4.4	Linearidade.....	38
3.4.5	Limite de detecção	38
3.4.6	Limite de quantificação.....	38
3.4.7	Precisão e exatidão.....	38
3.5	Aplicabilidade do Método.....	38
4	RESULTADOS.....	40
4.1	Métodos de Extração.....	40
4.1.1	Extração líquido-líquido.....	40
4.1.2	Extração em fase sólida.....	42
4.1.3	Dispersão de matriz em fase sólida.....	44
4.1.5	Comparação da EFS e DMFS	47
4.2	Validação do Método de Extração Fase Sólida.....	48
4.2.1	Seletividade	48
4.2.2	Efeito residual	50
4.2.3	Efeito matriz.....	50
4.2.4	Limite de quantificação e limite de detecção	51
4.2.5	Curva de calibração.....	51
4.2.6	Precisão e exatidão.....	54
4.3	Aplicabilidade do Método.....	55
5	CONCLUSÕES	57
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

A quantificação de fármacos veterinários em matrizes biológicas pode ser realizada através de diversas metodologias, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência a mais utilizada. Nos últimos anos, tivemos um avanço em termos de técnicas de análise, com criação de equipamentos que oferecem uma alta seletividade, sensibilidade e uma demanda menor de tempo, entretanto o desenvolvimento de novos métodos para preparo de amostra não cresce na mesma velocidade, sendo essa etapa o fator limitante de todo o processo analítico. Quando falamos de matrizes biológicas, matrizes que apresentam alto grau de complexidade, contendo um grande número de interferentes, podemos ter substâncias que coeluem com o analito, mas não detectadas e podem reduzir ou aumentar a intensidade do sinal desse analito, afetando a precisão, exatidão, robustez, seletividade e sensibilidade do método.

O principal desafio na elaboração de um método de extração para matrizes biológicas com a quantificação em detectores com baixa sensibilidade é o desenvolvimento de um método seletivo e que ofereça uma alta eficiência de extração, sendo necessário um trabalho exaustivo na elaboração do preparo de amostra.

A quantificação de fármacos e de seus metabólitos em matrizes biológicas é fundamental na avaliação e interpretação de estudos, como os farmacocinéticos, de biodisponibilidade e de bioequivalência. Esses estudos são utilizados na solicitação de registro de medicamentos novos, genéricos ou similares ou em caso de alterações ou inclusões nas formulações existentes no mercado. A qualidade desses estudos está diretamente relacionada com a qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos.

Até o presente momento as duas agências nacionais que disponibilizam guias para validação de métodos bioanalíticos é a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), por meio da resolução RDC nº 27 (Resolução de diretoria colegiada N.º 27 de 2012 cuja publicação é direcionada para validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos e o MAPA (Ministério da agricultura pecuária e abastecimento) que em 2011 publicou o Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica – Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários sendo direcionado para validação de procedimentos analíticos destinados ao

controle de qualidade de medicamentos veterinários, controle de qualidade de fármacos em produtos para alimentação animal e para a determinação de fármacos como contaminantes em rações. Neste trabalho a escolha do guia para ser utilizado na validação da metodologia foi baseada na diretriz de cada guia, sendo a resolução da ANVISA mais específica para o objetivo proposto, sendo direcionada para a validação de métodos bioanalíticos, diferentemente do guia do MAPA onde há uma abrangência maior, dificultando o uso de um procedimento único para finalidades tão distintas.

O objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação de fluazuron em plasma bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta. Dentre os objetivos específicos estão o estudo comparativo das seguintes técnicas para extração de fluazuron em amostra biológica (plasma bovino): dispersão de matriz em fase sólida (DMFS), extração líquido-líquido (ELL) e extração em fase sólida (EFS) e microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD); a validação do melhor método de extração e a aplicação do método escolhido, elaborando uma curva de concentração plasmática de fluazuron aplicada por via tópica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Técnicas Analíticas

As áreas que tem interesse em análise de compostos encontrados em amostras biológica, são muitas: ambiental, análises clínicas, farmacêutica, medicina legal (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). A área farmacêutica, em especial a biofarmacotécnica, que apresenta como objetivo estudar a influência dos fatores físicos e físico-químicos ligados ao fármaco e à forma farmacêutica sobre os efeitos do medicamento no organismo, utiliza como ferramenta as análises farmacocinéticas, onde o fármaco presente nas amostras biológicas é quantificado, possibilitando a construção das curvas de concentração do fármaco na matriz biológica em função do tempo. A partir dessas curvas, são determinados os parâmetros farmacocinéticos que após análise estatística definirão a biodisponibilidade relativa ou bioequivalência entre medicamentos avaliados (STORPIRTIS et al., 2009). Os resultados gerados por essas análises devem ser inequívocos e confiáveis.

Os estudos de biodisponibilidade e bioequivalência são preferencialmente realizados por meio da quantificação do fármaco e/ou metabólito ativo na circulação (sangue, plasma ou soro) ou urina. As amostras de plasma ou soro, pela facilidade de obtenção e armazenamento são as mais comuns. Amostras de sangue podem ser empregadas em casos de fármacos que se distribuem no interior das células sanguíneas. Amostras de urina são mais raras, já que esses estudos, são em geral, menos precisos e exatos que os estudos com quantificação do fármaco na circulação (STORPIRTIS et al., 2009).

Os avanços na área de preparo de amostras, e as técnicas analíticas modernas foram cruciais para o desenvolvimento de estudos de farmacocinéticos, possibilitando a detecção do fármaco e seus metabólitos em baixas concentrações e em uma amostra extremamente complexa, como o plasma.

As técnicas mais utilizadas para quantificação de compostos orgânicos em amostras biológicas são a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) e a cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-MS) ou massas sequencial (CL-MS/MS), detector de ultravioleta (CL-UV) ou detector de fluorescência (CL-FL).

Dentre as técnicas modernas de análise, a CL-MS tem sido considerada a técnica de referência, tanto na área clínica (fármacos/metabólitos/biomarcadores), como na ambiental (PRETO, 2015). As técnicas acopladas a espectrometria de massas apresentam maior sensibilidade e compatibilidade com as concentrações dos compostos de interesse. Contudo, toda técnica analítica, por mais seletiva e sensível que seja apresenta limitações, principalmente quando se trata de matrizes complexas, o processo prévio de preparação das amostras deve ser bem elaborado, pelos seguintes motivos:

- Eliminação prévia de partes dos componentes (interferentes) devido à complexidade das matrizes biológicas;
- Existência de proteínas que podem adsorver nas colunas cromatográficas ou nos capilares;
- Propicia a concentração das substâncias a serem analisadas, geralmente presente em nível de traços (DE OLIVEIRA et al., 2008; NOGUEIRA et al., 2015).

2.2 Métodos de Extração

Ao longo das últimas décadas, um tempo considerável tem se dedicado a melhorar a velocidade, resolução e automação de análise. Detectores rápidos de resposta sensível e linear, conversores digitais com ampla faixa, melhoraram a resolução, a sensibilidade, e principalmente, a velocidade da técnica analítica utilizada. Bombas capazes de reproduzir em modo isocrático e gradiente de forma rápida, injetores sem vazamentos, baixo volume de fluxo e injeção e colunas de micropartículas (CLAE – Cromatografia Líquida de alta eficiência) (LCGC, 2015).

Embora certos laboratórios de alta produtividade, em particular os laboratórios da indústria farmacêutica, usem o mais recente equipamento de automação e analisem centenas ou até milhares de amostras por dia, muitos laboratórios ainda estão usando técnicas baseadas em metodologias antigas com algum grau de miniaturização ou baixo nível de automação (MAJORS, 1996). Considerando que um processo analítico pode exigir alguns minutos, as vezes segundos, o tempo de preparo de amostra pode ser infinitamente mais longo. Os resultados de uma pesquisa (Figura 1) indicam que 61% do tempo de análise normalmente é gasto com a preparação da amostra, necessitando de mais tempo do que a coleta, análise e gerenciamento de dados. Claramente, acelerar ou automatizar a etapa de preparação da amostra reduz o tempo de análise e melhora a produtividade (LCGC, 2015).

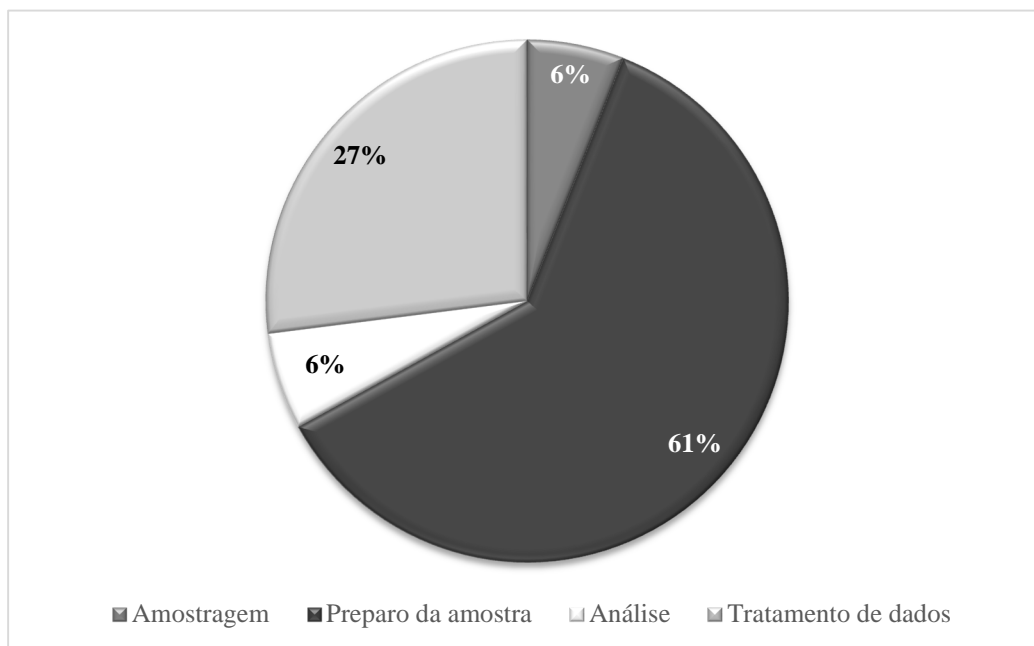


Figura 1 - Representação do tempo de análise(ADAPTADO GUIDELINES, 2016)

Idealmente, o método de preparo de amostra deve ser tão simples quanto possível, apresentando um menor tempo de análise; um menor número de etapas, para diminuir a possibilidade de introdução de erros; seletivo, ou seja, conter o menor número possível de interferentes, proporcionando maior detectabilidade; utilização de instrumentação de baixo custo; permitir a automação; e quando necessário a inclusão de uma etapa de concentração do analito a fim de obter uma concentração adequada para atingir o nível de detecção do instrumento utilizado e consumir quantidades mínimas de reagentes e solventes, atendendo a Química Verde.

As técnicas mais comumente utilizadas para extração de compostos presentes em fluidos biológicos são a extração líquido-líquido (ELL), precipitação de proteínas de fluídos biológicos (PP) e extração em fase sólida (EFS) (PRETO, 2015). Contudo, as tendências atuais apontam no sentido da utilização de menores quantidades de amostras, automação do método, utilização de métodos *on-line*, desenvolvimento de métodos menos agressivos ao meio ambiente com o uso de quantidade mínima ou nenhuma de solventes orgânicos (DE OLIVEIRA et al., 2008).

Atualmente, uma ampla variedade de métodos de preparo de amostras está disponível e muitos desses métodos têm sido empregados em análises de fármacos e/ou metabólitos em amostras biológicas, como o plasma (Tabela 1).

Tabela 1 - Aplicações de algumas técnicas recentes de extração de fármacos em plasma utilizando a cromatografia líquida.

Analitos	Método de extração	LIQ	Técnica de análise	Referência
Morfina, codeína, papaverina e noscapina	MELLD	0.5-5.0 µg/L*	UV	(AHMADI-JOUIBARI et al., 2013)
Benzodiazepínicos	MELLD	4.0 – 14.8 ng/mL	UV	(FERNÁNDEZ et al., 2013)
Odanacatib	ELL	50.9 mg/mL	UV	(KUMAR et al., 2013)
Astemizol	ELL	2.5 ng/ mL	MS/MS	(BACK et al., 2015)
Ziprasidona	MESE	1 ng/mL.	UV	(MERCOLINI et al., 2014)
Remifentanil	MESE	0.05 ng/mL.	MS/MS	(SAID et al., 2011)
Amiodarona e desetilamiodarona	MESE	0.1 µg/mL	UV	(RODRIGUES et al., 2013)
Paracetamol	m-PMI	0.17-0.4 µg/L	UV	(AZODI-DEILAMI et al., 2014)
Lamotrigina	PP	0.6 mg/L	UV	(BALDELLI et al., 2015)
Fosfomicina	PP	5 mg/L	MS/MS	(PARKER et al., 2015)
Quercetina e Resveratrol	PP	2.87-3.75 ng/mL	UV	(KUMAR; LATHER; PANDITA, 2016)
Rifampicina	ESBA	0.125 µg/mL	UV	(BALBÃO et al., 2010)
Fluoxetina, Venlafaxin, Citalopram e metabólitos	ESBA	0.2–2 µg/L	FL	(CHAVES et al., 2015)
Propranolol	ESBA	100 pg/mL	FL	(FARHADI; FIRUZI; HATAMI, 2015)
Midazolam	ELS	0.2 nmol/L	MS/MS	(SVANSTRÖM et al., 2012)
Docetaxel	EFS	0.14 – 0.76 µg/L	MS/MS	(NAVARRETE et al., 2013)
Tensirolimo	<i>On-line</i>			
Sirolimus				
Fipronil	EFS	5.0 ng/mL	UV	(CID et al., 2012)

*O limite inferior de quantificação (LIQ) não foi informado, o resultado apresentado corresponde ao LD (limite de detecção).

2.3 Princípios Fundamentais do Preparo de Amostras

Antes de iniciar qualquer metodologia analítica, é fundamental o conhecimento das propriedades químicas do (s) analito (s) de interesse, além das propriedades da matriz na qual o analito esteja presente e da técnica que será empregada para determinação.

Considerando a matriz, devem ser analisados o seu estado físico (sólido, líquido ou gasoso), o tamanho da amostra, os conteúdos de matéria orgânica, gordura, pigmentos, proteínas e o pH. Quanto ao analito, deve-se analisar as suas propriedades físicas, químicas (massa molar, carga, polaridade, volatilidade, pKa), propriedades que permitam a sua detecção (absorção UV-Vis, fluorescência, eletroatividade) e sua concentração (JARDIM, 2010).

Entre inúmeras propriedades do analito, algumas são fundamentais para a compreensão e elaboração de um protocolo de extração: a pressão de vapor, a volatilidade, a solubilidade e a hidrofobicidade. Essas propriedades fundamentais determinam, por exemplo, o transporte de substâncias químicas no corpo humano, no meio ambiente por ar, água e solo, e entre fases imiscíveis durante uma extração analítica (MITRA, 2003).

Todos os procedimentos de extração são baseados na lei de distribuição de Nernst (BUSZEWSKI; SZULTKA, 2012).

$$K_D = \frac{[A]_H}{[A]_L} \quad \text{Equação 1}$$

Onde o analito de interesse (A), está em contato com duas fases, a matriz na qual ele está dissolvido (L), que pode ser hipoteticamente uma matriz aquosa e a segunda fase (H) que pode ser um sólido, líquido, gás ou fluido supercrítico. Com as fases L e H em contato, ocorre então a distribuição do analito entre as duas fases. A otimização do método de extração é baseada no K_D (coeficiente de distribuição ou partição), um K_D grande, indica um elevado grau de extração do analito da fase L para a fase H. O analito extraído pode ser então recuperado a partir da fase H para posterior procedimento de extração ou de análise instrumental (MARTINS et al., 2012).

Através da expressão é possível obter a concentração ou atividade (soluções não ideais) do analito em cada uma das fases L e H, à temperatura constante (MARTINS et al., 2012).

A otimização do método de extração, deve ser avaliada a partir do valor de K_D , quanto maior for o valor da constante, maior é o grau de extração do analito da fase L para a fase H (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

A pressão de vapor de um líquido ou sólido é a pressão do composto na fase gasosa em equilíbrio com a fase sólida ou líquida condensada do composto na forma pura a uma determinada temperatura, sendo efetivamente dependente da temperatura. A pressão de vapor de substâncias químicas varia amplamente de acordo com o grau de atrações intermoleculares.

Quanto mais forte a atração intermolecular, menor a manigitude da pressão de vapor (MITRA, 2003).

A volatilização de uma espécie química da superfície de um líquido pode ser definida como o processo de partição pelo qual uma espécie se distribui entre duas fases, a fase líquida e a fase gasosa. Algumas moléculas orgânicas são ditas voláteis, pois possuem uma grande capacidade de atravessar essa interface líquido-gás. Conseqüentemente, quando a espécie se volatiliza, a concentração da mesma na solução é reduzida (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015; MITRA, 2003).

Quando falamos de um processo de extração, se uma técnica em particular, aplicada a uma solução, depende da volatilidade do soluto entre as fases gasosa e líquida, é necessário um parâmetro para prever este comportamento. Nesse caso, a volatilidade ou fugacidade (tendência de escape) de um soluto A qualquer pode ser estimado por meio da razão da distribuição K_D , do soluto na fase gasosa G, e na fase líquida L, também chamada de constante da lei de Henry adimensional, H' (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015; MITRA, 2003).

$$H' = K_D = \frac{[A]_G}{[A]_L} \quad \text{Equação 2}$$

Para compostos neutros diluídos, a constante de Lei de Henry pode ser calculada a partir da razão entre a pressão de vapor, P_{vp} , e a solubilidade S.

$$H = \frac{P_{vp}}{S} \quad \text{Equação 3}$$

Onde: $P_{vp} = \text{atm}$; $S = \text{mol/m}^3$; $H = \text{atm.m}^3/\text{mol}$.

Alguns fatores podem afetar a constante da lei de Henry, como temperatura, natureza do analito e da amostra, pH, presença de sais e partículas. Quanto maior a volatilidade, menor a afinidade do analito pela matriz, portanto maior a quantidade do mesmo que pode ser transferido para a fase gasosa. A temperatura deve ser otimizada a cada situação, pois sua variação pode causar imprecisão nas medidas. A adição de eletrólitos fortes a amostras aquosas aumentam de forma significativa a eficiência dos analitos para a fase gasosa, principalmente se os analitos forem pouco polares (MITRA, 2003).

Através da constante da lei de Henry, pode se determinar quais as técnicas de extração são mais apropriadas para extrair um soluto de uma solução. Se H de um soluto for menor que H de um solvente, o soluto é considerado não volátil naquele determinado solvente e a concentração do soluto irá aumentar à medida que o solvente evapora. Se H do soluto for maior

que o H do solvente , o soluto é considerado como semivolátil. (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015) .

A solubilidade pode ser definida, como a quantidade máxima de uma substância que pode ser dissolvida em outra a determinada temperatura. Essa propriedade pode ser determinada de forma experimental ou estimada a partir da estrutura molecular. A solubilidade pode ser utilizada para estimar a constante de Henry (MITRA, 2003).

A constante da lei de Henry dimensional (H) calculada pela equação 3, pode ser convertida na constante da lei de Henry adimensional (H') (equação 2) por meio da seguinte expressão:

$$K_D = \frac{P_{vp}(MM)}{0.062ST} \quad \text{Equação 4}$$

Onde: P_{vp} = mmHg ; MM = g/mol; S = mg/L; T = K; constante universal de gases = 0,062.

De acordo com a lei de Henry, para estimação da volatilização de um soluto orgânico, é necessário conhecer a pressão de vapor e a solubilidade do mesmo (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

A hidrofobicidade influencia a distribuição de um soluto entre fases imiscíveis, durante o processo de extração analítica. Para isso, existe um parâmetro que mede a hidrofobicidade, que descreve o transporte entre as fases aquosa e orgânica (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Através equação geral da constante de equilíbrio (equação 1) pode se demonstrar a distribuição de um soluto A, qualquer, entre as fases aquosa (W) e orgânica, n-octanol (O) como:

$$K_{OW} = P = \frac{[A]_O}{[A]_W} \quad \text{Equação 5}$$

O coeficiente de partição n-octanol/água (K_{OW}), que também pode ser definido como o logaritmo do coeficiente de partição é um parâmetro adimensional, de definição de hidrofobicidade baseada no sistema de referência n-octanol. coeficiente é diretamente proporcional à partição de um soluto entre a fase aquosa e diversas outras fases hidrofóbicas (MITRA, 2003).

2.4 Extração Líquido-Líquido

A extração líquido-líquido (ELL) é um método clássico de extração e pré-concentração de analitos, ainda muito utilizado em análises de alimentos, pesticidas, produtos naturais, drogas de abuso, biomoléculas e numerosas aplicações para análises de produtos farmacêuticos e seus metabólitos (BYLDA et al., 2014).

A técnica é baseada na distribuição ou partição de um composto entre dois líquidos ou fases imiscíveis, nos quais este composto apresenta diferentes solubilidades. Geralmente uma das fases é aquosa e a outra um solvente orgânico (BYLDA et al., 2014).

A proporção de distribuição de um composto entre duas fases imiscíveis é constante e é explicada pela lei de distribuição de Nernst (Equação 1)

Em geral, são necessárias duas ou três extrações com novas porções de solvente para a obtenção de altas recuperações e ao final é feita a mistura dos extratos, com a presença do composto de interesse, de cada uma das repetições (MARTINS et al., 2012).

Na ELL a mistura do solvente orgânico com a amostra aquosa é promovida por agitação mecânica ou instrumental, e a formação de bolhas ou gotas de solvente orgânico garante o aumento da superfície de troca para favorecer a partição dos analitos entre as fases (MARTINS et al., 2012).

Há inúmeros fatores que devem ser avaliados com o propósito de aumentar a eficiência na extração, tais como: escolha do método, do solvente extrator, definição dos volumes de amostra e solvente, tempo de extração, necessidade e procedimento de evaporação do solvente extrator. O uso de padrão interno, é uma alternativa para minimizar os erros operacionais. A adição de um sal neutro e inerte a fase aquosa, promove o aumento da força iônica (*salting out*) podendo diminuir a concentração do composto na fase aquosa. A supressão da ionização de compostos iônicos ou ionizáveis, torna o composto mais solúvel na fase orgânica. E uma outra estratégia para melhorar a recuperação na ELL com analitos ionizados é a adição de um íon de carga oposta (contra íon) que manterá a neutralidade de cargas (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009).

O solvente extrator na ELL, deve apresentar as seguintes características: ser pouco solúvel em água (<10%); volátil (facilitando a remoção após extração); ser compatível a técnica analítica apresentada e altamente pura. A segurança, inflamabilidade e toxicidade também

devem ser consideradas no momento da seleção do solvente extrator(SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009).

A ELL convencional está entre as técnicas mais empregadas para extração de matrizes biológicas. Os avanços recentes da técnica consistem na minituarização, utilizando pequenas quantidades de amostras e solventes orgânicos e possibilitando a utilização de métodos *on-line* (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

A ELL possui a vantagem de combinar várias etapas que envolvem o preparo de amostras em uma única etapa, além de apresentar simplicidade, baixo investimento e a possibilidade de utilizar grandes variedades de solventes puros e que fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Embora a ELL seja um método de preparo de amostras muito eficaz, ele apresenta limitações. Como a formação de emulsões que podem ocorrer na interface entre as fases líquidas, requer grande quantidade de solventes orgânicos, muitos deles tóxicos, a dificuldade de tornar o processo automatizado, analitos podem se ligar a compostos com alto peso molecular (ex: interação fármaco-proteína) ou adsorver em materiais particulado, além da solubilidade entre as duas fases (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009).

2.5 Extração em Fase Sólida

A extração em fase sólida (EFS) surgiu em 1976 para suprir as desvantagens apresentadas pela extração líquido-líquido, tais como a separação incompleta das fases; as baixas porcentagens de recuperação; dificuldade de automação e o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos e, hoje consiste no método mais popular de preparo de amostra, sendo utilizada pela maioria das análises cromatográficas em laboratórios de rotina (JARDIM, 2010).

A EFS, na sua forma clássica, utiliza fases sólidas também denominada sorventes, recheadas em cartuchos, nas formas de barril ou seringa (JARDIM, 2010).

As fases sólidas utilizadas em EFS são similares às fases estacionárias empregadas em cromatografia líquida em coluna, logo os mecanismos de separação também são similares. Os principais mecanismos são: adsorção e partição (fase normal e reversa), troca iônica e exclusão. Estes mecanismos estão associados aos processos químicos, físicos e mecânicos que ocorrem durante a separação. As principais forças químicas e físicas atuantes entre as moléculas do analito e do sorvente, são as de ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, dipolo-dipolo

induzido, dipolo induzido-dipolo e interações iônicas (JARDIM, 2010).

Na EFS os analitos a serem extraídos são particionados entre a fase sólida e a fase líquida (amostra), os analitos devem ter uma maior afinidade pela fase sólida do que pela matriz. A EFS consiste de quatro etapas: condicionamento do cartucho, carregamento da amostra, etapa de lavagem (opcional) para remoção de interferentes e eluição para dessorção dos analitos (LANÇAS, 2004).

A etapa de condicionamento tem como objetivo ativar o material dentro do cartucho, o solvente a ser empregado depende do sorvente a ser ativado e da matriz a ser processada. Sempre que possível opta-se por solventes com características similares ao solvente na qual a amostra está solubilizada. Nessa etapa é importante que o cartucho não seque, evitando assim caminhos preferenciais que conduzem o insucesso da extração. Essa etapa de condicionamento é essencial em fases de sílicas organofuncionalizada, onde as cadeias orgânicas podem estar entrelaçadas. Essa etapa ordena as cadeias hidocarbonadas aumentando a superfície disponível para interação com o analito. Em fases poliméricas a maior parte da área superficial está na superfície interna dos poros, sendo imprescindível que a fase líquida penetre nos poros. A permeação completa da água nos poros só é garantida pela molhabilidade do polímero, primeiro com um solvente orgânico miscível com água. Portanto, é importante que a fase sólida permaneça úmida. A adição da água em maior quantidade, desloca o solvente orgânico da

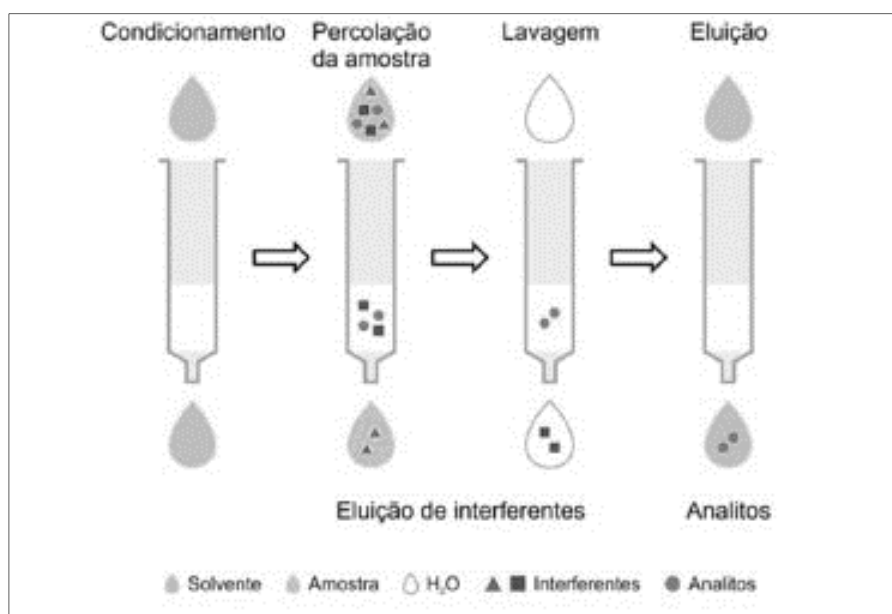


Figura 2 - Etapas da extração em fase sólida (CALDAS et al., 2011).

ativação e vai ocupando o espaço entre as moléculas orgânicas da fase sólida solvatada, o que

permite o contato dos analitos com a fase sólida na percolação da amostra. Sem essa etapa ou quando ocorre a secagem da fase antes que a amostra seja adicionada, ocorre o colapso das moléculas orgânicas e a água passa por caminhos preferenciais, mais hidrofílicos, não acontecendo o contato dos analitos com a fase sólida, portanto não há retenção dos mesmos (PEDROSO, 2007).

Na etapa de carregamento de amostra, os fatores que influenciam é o volume da amostra e a velocidade de carregamento da mesma. Para se obter a eficiência máxima de extração é necessário determinar o volume máximo de amostra que pode ser processado para maximizar a recuperação do analito. A velocidade de carregamento da amostra ideal é a lenta, com vazão menor que 2 mL/min (JARDIM, 2010).

A etapa de limpeza (*clean-up*) é importante para eliminar os interferentes da matriz. O solvente ideal é o próprio solvente da amostra ou misturado com solvente orgânico desde que ele não remova os analitos de interesse (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Para a eluição do analito é ideal que se use um volume pequeno de solvente, para que não seja necessária a inclusão de uma etapa de concentração, com evaporação do solvente. Caso contrário o solvente utilizado, deve ser facilmente evaporado, para o extrato poder ser ressuspensionado em um pequeno volume de fase móvel (TANKIEWICZ; FENIK; BIZIUK, 2011)

A EFS como um método seletivo oferece diversas opções de adsorventes, que vão desde os adsorventes tradicionais de fase reversa (C₁₈, C₈), fase normal (sílica, alumina), troca iônica, modo misto (troca iônica + fase reversa) e resinas funcionalizadas à base de polímeros de estireno-divinilbenzeno (EDVB). Entre eles os grupos mais utilizados são sílica e sílica funcionalizadas, adsorventes poliméricos, carbono poroso ou grafitado e novos adsorventes de extração incluindo polímeros molecularmente impressos e imunosorventes (BUSZEWSKI; SZULTKA, 2012).

As vantagens apresentadas pela EFS são: menor consumo de solvente orgânico, não formação de emulsões, facilidade de automação, altas porcentagens de recuperação do analito, volumes reduzidos de resíduos tóxicos, capacidade de aumentar seletivamente a concentração do analito e a disponibilidade comercial de muitos equipamentos e sorventes. Dentre as desvantagens estão o tempo elevado de análise, altos custos dos cartuchos e dos dispositivos comerciais multivias (*manifolds*) e entupimento de cartuchos dependendo da amostra utilizada (JARDIM, 2010).

2.5.1 Dispersão de matriz em fase sólida

A dispersão de matriz em fase sólida (DMFS) foi introduzida em 1989 por Barker para extração de resíduos de medicamentos em tecido animal, a técnica trouxe como novidade obter o isolamento de analitos por dispersão de tecidos num suporte sólido, eliminando as dificuldades encontradas na EFS, como a necessidade de homogeneização prévia da amostra de tecido e remoção dos detritos antes da aplicação na coluna (CAPRIOTTI et al., 2010).

A técnica surgiu inicialmente para extração de amostras sólidas, mas também tem sido aplicada para amostras semissólidas e amostras biológicas altamente viscosas (BARKER, 2007), como o plasma.

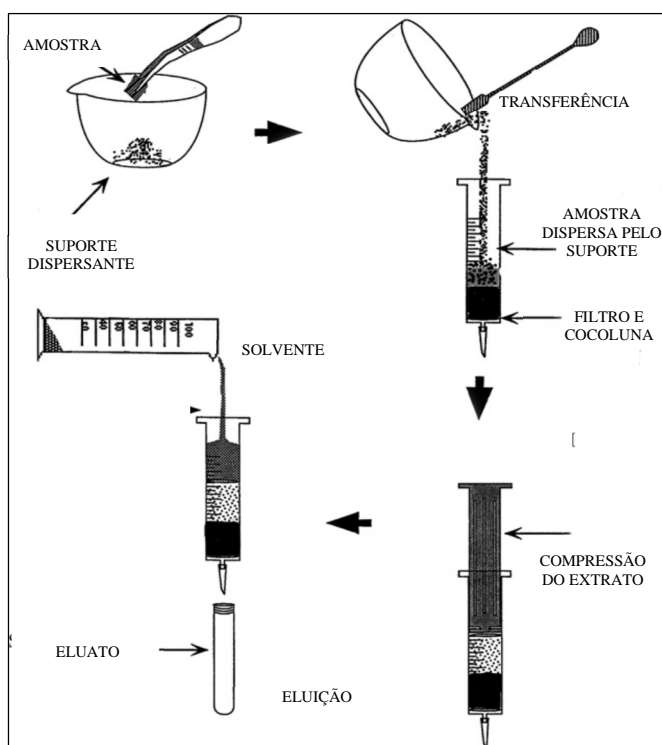


Figura 3 - Etapas do processo de dispersão de matriz em fase sólida (BARKER, 2007)

O processo pode ser dividido em duas etapas, sendo que a primeira consiste no preparo do cartucho contendo a amostra e a segunda na eluição dos analitos de interesse (LANÇAS, 2004).

A figura 3 ilustra as etapas envolvidas no processo de dispersão de matriz em fase sólida.

- A fase sólida é pesada e transferida para um recipiente adequado (almofariz de vidro ou porcelana) para posterior trituração;

- A amostra é adicionada à fase sólida e ambas são trituradas, até obtenção de uma pasta homogênea. A amostra é distribuída uniformemente sobre a superfície da fase sólida;
- A amostra é então colocada no cartucho, que contém um filtro inferior e depois da adição da amostra é colocado um segundo filtro;
- A seguir adiciona-se o solvente e procede-se a eluição com o auxílio de um sistema à vácuo, para diminuir o tempo de extração (LANÇAS, 2004).

Depois da extração, a amostra pode ser submetida a etapa de *clean-up* ou não, geralmente, é utilizado um material co-sorvente na parte inferior da coluna a ser empacotada com a mistura. A escolha do co-sorvente, geralmente florissil, alumina, sílica C18 ou C8, depende da fase sólida dispersante utilizada e das características físico-químicas do analito de interesse (CAPRIOTTI et al., 2010).

Os materiais utilizados como fase sólida variam desde a fase reversa (sílica ligada a C8 e C18) a fase normal (alumina ou florissil e fases polares quimicamente ligadas a sílica). (CAPRIOTTI et al., 2013).

Os solventes selecionados para eluição estão diretamente ligados a natureza do material sólido. Como na EFS clássica uma estratégia pode ser seguida para obter um extrato limpo, uma etapa de lavagem com um solvente adequado antes da eluição do analito, caso contrário interferentes da matriz retidos no sorvente podem ser eluídos junto com o analito (CAPRIOTTI et al., 2010).

Os fatores envolvidos no funcionamento do sistema de extração da DMFS são:

- Os tamanhos dos poros da sílica não são críticos nessa técnica. Sílica com poros de 60 Å, usualmente empregada em EFS, é adequada (LANÇAS, 2004);
- O tamanho das partículas da fase sólida também não é crítico. Partículas maiores, usualmente empregadas em EFS (40 µm), dão resultados similares às menores (≤ 10 µm) (LANÇAS, 2004), além disso partículas menores levam um tempo de eluição excessivo, necessitando de pressões altíssimas para se obter um fluxo adequado e são mais caras (BARKER, 2007);
- A natureza química da fase sólida é importante no processo. Assim, a escolha do suporte-adsorvente recai na polaridade do analito e na natureza da matriz, de modo

que o isolamento de analitos mais polares é realizado com suportes sólidos polares e o de analitos menos polares com suportes menos polares (MAFFEI, 2009).

- A melhor relação entre a quantidade de amostra/suporte sólido é 4:1 (em massa). Esta razão depende da aplicação e deve ser analisada como uma variável importante durante o desenvolvimento do método (BARKER, 2007);
- O pré-condicionamento da fase sólida aumenta a recuperação dos analitos e acelera o processo de mistura da amostra e a fase, devido a quebra da diferença de tensão superficial que pode existir entre a amostra e a fase sólida (BARKER, 2007);
- O tempo de trituração é importante e deve ser investigado durante o desenvolvimento do método (LANÇAS, 2004);
- O volume de eluição deve ser também avaliado (BARKER, 2007).

Comparando a DMFS com a EFS clássica, existe um maior número de interações físicas e químicas no sistema. Na DMFS as interações entre os componentes individuais da amostra e o analito de interesse envolvem o analito com o suporte sólido, o analito com a fase orgânica ligada, o analito com a matriz dispersa, a matriz com o suporte sólido, a matriz com fase orgânica ligada e todos estes componentes interagindo com o solvente de eluição, interações estas que ocorrem simultaneamente (CAPRIOTTI et al., 2013). Além disso todo esse processo de interações ocorrem ao longo de toda a coluna de DMFS, formada pela mistura da matriz como dispersante, enquanto em EFS as interações ocorrem nos primeiros milímetros da coluna de EFS (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

A DMFS tem diversas aplicações, especialmente na indústria de alimentos, tais como a determinação de pesticidas em frutas, alimentos de bebê, sucos de frutas, determinação de medicamentos veterinários em tecidos, resíduos antibacterianos em alimentos, antibióticos em leite (MAJORS, 2014) e em análises de amostras biológicas (LANÇAS, 2004).

Várias aplicações com DMFS têm usado combinações de técnicas como a extração líquido pressurizada (ELP) associada a DMFS, associação do ultrassom com a técnica, utilização de um sistema minituarizado (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015), utilização de polímeros molecularmente impressos (PMI) e nanotubos de carbono como materiais de suporte (CAPRIOTTI et al., 2013) e mais recentemente foi desenvolvida uma patente para aplicação de um campo elétrico no procedimento de extração da DMFS (E-DMFS) (CAMPOS et al., 2015).

A DMFS oferece como vantagens, sua simplicidade e flexibilidade, diferentemente dos métodos clássicos onde são necessárias etapas de *clean-up*, grande quantidade de amostras, adsorvente e solventes orgânicos (CAPRIOTTI et al., 2010).

Apesar da simplicidade e da facilidade de execução, a técnica apresenta algumas limitações como necessidade de manipulação grande número de variáveis a serem otimizados, dificuldade de automatização do procedimento e baixa recuperação de analitos fortemente sorvidos (CAMPOS et al., 2015). E embora a DMFS apresente inúmeras vantagens, ela não é sempre indicada como mais eficaz do que outras técnicas. Vale ressaltar que ao lidar com análise de matrizes complexas, muitas vezes é necessário uma combinação de técnicas diferentes para alcançar o desempenho exigido em termos de precisão e sensibilidade (CAPRIOTTI et al., 2010).

2.5.2 Microextração líquido-líquido dispersiva

A microextração líquido líquido dispersiva (MELLD) foi proposta em 2006. É baseada em um sistema ternário de solventes. A MELLD é uma técnica de extração e pré-concentração de amostras que atende aos requisitos de miniaturização, baixo custo, rapidez e eficiência de extração e com alto potencial para aplicação direta em campo (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015; MARTINS et al., 2012).

O processo de extração ocorre de forma muito parecida com aquele da ELL tradicional. Na ELL a mistura do solvente orgânico com a amostra aquosa é obtida por agitação garantindo o aumento da superfície de troca promovendo a partição do analito entre as fases. Na MELLD a mistura é feita pela injeção rápida de uma mistura de solventes, um solvente dispersor miscível na fase aquosa e um solvente extrator miscível na fase orgânica. O solvente dispersor é responsável pela dispersão do solvente extrator na forma de microgotas, fazendo com que a partição ocorra em uma grande área superficial (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015; MARTINS et al., 2012). Enquanto o tempo de extração na ELL é definido pelo tempo de agitação da mistura, na MELLD ele é definido pelo intervalo entre a injeção da mistura de solventes e a centrifugação.

A técnica consiste em duas etapas, a primeira etapa consiste na injeção de uma mistura de solventes adequados solvente extrator e solvente dispersor na amostra aquosa contendo os analitos. O solvente extrator é disperso na fase em partículas muito finas, extraindo os analitos, a dispersão do solvente extrator é feita com o auxílio do solvente dispersor, que deve ser solúvel na fase aquosa e na fase orgânica. A segunda etapa é a

centrifugação da solução e a transferência da fase sedimentada para o vial onde o analito será determinado (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015; MARTINS et al., 2012).

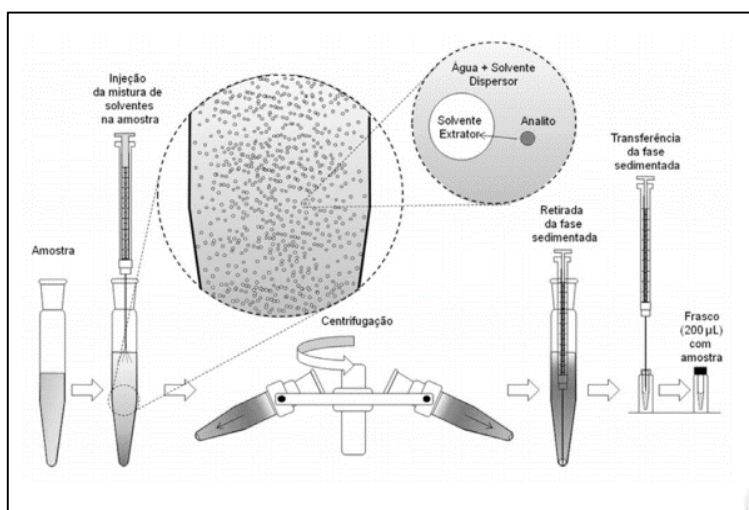


Figura 4 -Etapas da técnica de MELLD (CALDAS et al., 2011).

A MELLD é baseada no processo de partição dos analitos entre duas fases líquidas imiscíveis, a fase aquosa (amostra), fase orgânica (solvente orgânico). A solubilização do analito em qualquer uma das fases depende da polaridade relativa do sistema, os analitos são geralmente apolares apresentando maior afinidade pela fase orgânica em comparação com a fase aquosa que é altamente polar (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015; MARTINS et al., 2012).

A DLLME pode ser caracterizada como técnica de extração exaustiva e de equilíbrio. Pode ser considerada uma técnica exaustiva quando a quantidade de analito contida na fase orgânica for próxima a 100%, e a exatidão do método é expressa em termos de recuperação, sendo calculada através da seguinte equação:

$$R(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

C_1 = concentração do analito determinada na amostra fortificada

C_2 = concentração do analito na amostra não fortificada

C_3 = concentração do analito adicionada na amostra fortificada

Caso a transferência do analito entre a fase aquosa e a fase orgânica for parcial, a extração é considerada como uma técnica de equilíbrio. A recuperação (R) pode ser definida como a quantidade total de analito, em porcentagem, que é transferida para a fase orgânica ao final da extração (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

$$R(\%) = \frac{K_D V_{org}}{K_D V_{org} + V_D} \quad \text{Equação 7}$$

K_D = Coeficiente de distribuição ou partição

V_{org} = Volume da fase orgânica

V_D = Volume da fase aquosa

A extração em duas fases é ideal para extração de analitos hidrofóbicos ou seja, com elevados coeficientes de partição (entre 500 e 1000 ou maiores) , a recuperação pode ser favorecida com o aumento da razão entre as fases orgânica e aquosa (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Os principais parâmetros que afetam a eficiência da extração por MELLD são: volume e tipo de solvente extrator e de solvente dispensor, tempo de extração, força iônica e pH.

O parâmetro principal da MELLD é a escolha do solvente extrator. A escolha deve ser feita com base na densidade do solvente, os que apresentam maior densidade que a água, capacidade de extração dos analitos e adequação a técnica analítica a ser empregada (CALDAS et al., 2011).

O volume do solvente extrator deve ser o menor possível e suficiente para extrair o analito. A principal característica a ser observada na escolha do solvente dispensor é a miscibilidade na fase orgânica (solvente extrator) e na fase aquosa. O volume do solvente dispensor influencia diretamente no volume da fase sedimentada, logo afeta a eficiência da extração (CALDAS et al., 2011).

Os solventes extrator e dispensor devem ser adicionados juntos na amostra, para que ocorra a formação da fase sedimentada. E a agitação deve ser feita após a mistura dos solventes e antes da centrifugação , promovendo um contato íntimo e prolongado entre as duas fases orgânica e aquosa (CALDAS et al., 2011).

O aumento da força iônica também influencia no volume da fase sedimentada, provocando a diminuição da solubilidade do solvente extrator na presença de um sal (CALDAS et al., 2011).

O pH é otimizado de acordo com a acidez ou basicidade dos compostos. Compostos ácidos normalmente requerem que a amostra seja acidificada para permanecerem na mesma forma molecular e facilitar a partição dos analitos (CALDAS et al., 2011).

A técnica tem sido muito utilizada para extração e concentração de compostos orgânicos como plastificantes, fármacos, agrotóxicos e compostos inorgânicos (CALDAS et al., 2011)

Do ponto de vista comercial, econômico e ambiental, as vantagens da MELLD em relação aos métodos convencionais com solvente são a simplicidade de operação, rapidez, baixo custo, fácil manipulação, alta recuperação e alto fator de enriquecimento e compatibilidade com as técnicas analíticas mais empregadas como cromatografia gasosa e líquida (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015; CALDAS et al., 2011).

A principal desvantagem da MELLD é que o solvente extrator é limitado aos solventes de maior densidade que a água, para que ocorra a sedimentação por centrifugação. Estes solventes são geralmente solventes clorados como clorobenzeno, clorofórmio e tetracloreto de carbono. Todos são potencialmente tóxicos para a saúde humana e para o meio ambiente (FAEZEH, KHALILIAN AND MOHAMMAD, 2014).

2.6 Fluazuron

Fluazuron é um regulador de crescimento de insetos pertencente à classe dos derivados de benzoilfeniluréias, uma classe de inibidores da síntese de quitina. Sua ação é de forma sistêmica, podendo ser aplicado por meio de injeções (via subcutânea) ou sobre o lombo do animal (*pouren*), em ambas as formas o princípio ativo é absorvido pelo animal e distribuído na corrente sanguínea do bovino (EMEA, 2005).

Ao sugar o sangue o carrapato entra em contato com o fluazuron que interfere na produção de quitina, a qual é responsável pelo endurecimento da cutícula dos carrapatos. Assim os carrapatos não podem mudar de fase (larva, ninfa e adulta) e crescer, além de gerar má formação dos ovos (EMEA, 2005). Outro fator é que a permeabilidade dos ductos salivares pode ser comprometida, causando um desequilíbrio de hemolinfa nos carrapatos (DE OLIVEIRA et al., 2012).

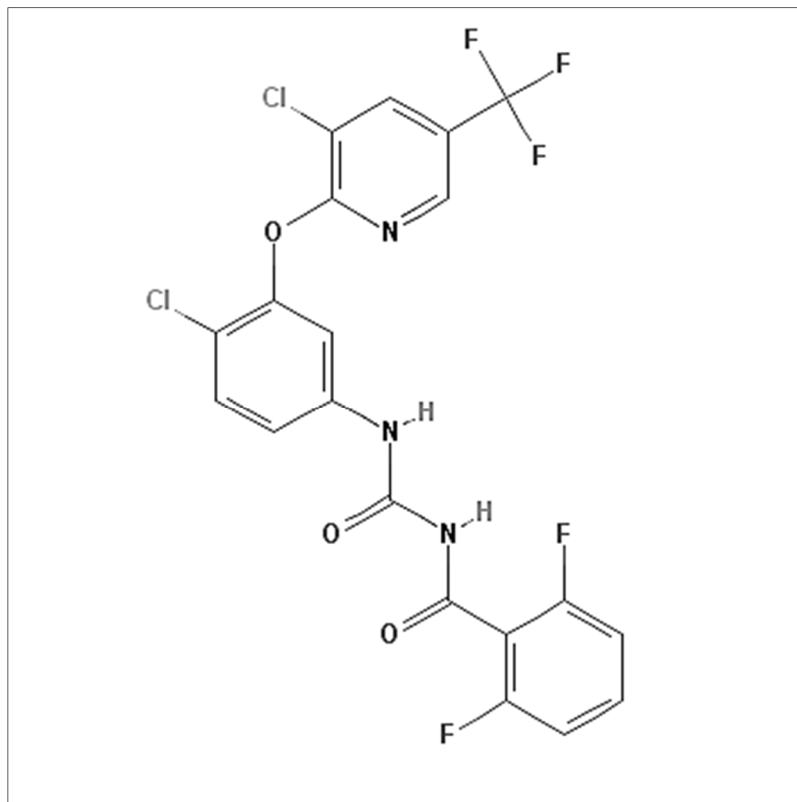


Figura 5- Estrutura química Fluazuron (Pubchem,2016).

A eficácia do fluazuron é descrita na literatura por diversos autores, sobre larvas e ninfas de carrapatos, como em *R. microplus* (BULL et al., 1996), *R. sanguineus* (OLIVEIRA et al., 2012), além de outros ectoparasitos como o ácaro causador de sarna *Sarcoptes scabiei* em suínos (PASAY et al., 2012) e a pulga *Ctenocephalides felis felis* em cães (VIEIRA, 2009). Entretanto já existe ao menos um relato de resistência a este princípio ativo (RECK et al., 2014).

Na tabela abaixo (tabela 2) são descritas as propriedades físico-químicas do analito ,essas propriedades devem ser compreendidas para escolha da técnica de preparo de amostras.

Tabela 2 - Propriedades Físico-Químicas do fluazuron (NCBI, 2016)

Fórmula química	C ₂₀ H ₁₀ Cl ₂ F ₅ N ₃ O ₃	
Nomenclatura IUPAC	1-[4-chloro-3- (3-chloro-5-trifluoromethyl -2-pyridyloxy) phenyl]-3-(2,6 difluorobenzoyl) urea	
Massa molecular (g/mol)	506.21	
Solubilidade – água 20°C (mg/L)	0.02	
Solubilidade – solventes orgânicos 20°C (mg/L)	700	n-Octanol
	900	Isopropanol
	2400	Metanol
	30000	Hexano
Ponto de ebulição (°C)	219	
Log P (Octanol-água) pH 7, 20°C	5.1	
Pressão de vapor 25°C (mPa)	1.2 x 10 ⁻⁷	
Constante de Henry's law 25°C (Pa m³ mol/L)	3.04 x 10 ⁻⁶	

Os métodos descritos na literatura para análise de fluazuron em matrizes variadas (chá, tecidos, verdura e sementes) utilizam métodos de extrações tradicionais, como a ELL (ARMISHAW; WARD; MILLAR, 1996; HUI-YING et al., 2009; LUXINLUN, 2011; YAMADA et al., 2006) e EFS (CHEN et al., 2014; ZHANG et al., 2013), utilizando como técnica de análise CLAE-UV e CLAE-MS/MS. No entanto há uma escassez da aplicação de métodos de extração modernos para análise de fluazuron em fluidos biológicos. Diante deste contexto, o objetivo deste presente trabalho é comparar métodos de extração tradicionais e modernos, obtendo um método robusto, preciso e exato para quantificação de fluazuron em plasma bovino.

2.7 Biodisponibilidade e Farmacocinética

Durante a década de 1960, o desenvolvimento das técnicas analíticas permitiu a elaboração de métodos sensíveis o suficiente para permitir a quantificação de drogas ou metabólitos, inicialmente na urina, e posteriormente no plasma, tornando possível a avaliação

e comparação da biodisponibilidade de diferentes formulações em voluntários, podendo demonstrar que diferenças significativas entre estas podem ocorrer (ANVISA, 2002).

Esses estudos se iniciaram devido a constatação de vários casos de ineficácia clínica e intoxicações de pacientes com o uso de medicamentos, sendo necessário o estabelecimento de novos critérios para o registro de medicamentos, incluindo-se estudos de biodisponibilidade (STORPIRTIS et al., 2009)

O conceito de biodisponibilidade já está definido no próprio termo, disponibilidade biológica. A definição sugerida pela FDA é a mais utilizada mundialmente e refere-se à quantidade absorvida de um fármaco, a partir de sua forma farmacêutica, e a velocidade pela qual esse processo ocorre. De acordo com essa definição verifica-se que a biodisponibilidade é uma propriedade que deriva da administração do medicamento ao organismo e que pode citar a forma farmacêutica, deixa claro que a mesma pode influenciá-la (BUENO, 2005).

A determinação da biodisponibilidade é realizada através de estudos farmacocinéticos que consiste na administração do medicamento ao organismo e a coleta de líquidos biológicos em tempos predeterminados, com posterior quantificação do fármaco empregando-se método bioanalítico desenvolvido e validado para esta finalidade (STORPIRTIS et al., 2009)

Os principais parâmetros farmacocinéticos utilizados para a avaliação da biodisponibilidade são:

- Pico de concentração máxima ($C_{máx}$);
- Tempo para ocorrer o pico ($T_{máx}$);
- Meia vida de eliminação ($t_{1/2}$)
- Área sob a curva (ASC).

Essas medidas são obtidas diretamente das curvas de concentração sanguínea versus tempo, construídas no estudo (ANVISA, 2002;SHARGEL et al., 2004).

A área sob a curva de concentrações plasmáticas versus tempo (ASC) corresponde ao principal parâmetro relativo à biodisponibilidade, pois representa a quantidade de fármaco absorvido. Esta é uma medida da extensão da absorção ou da exposição do organismo ao fármaco após a administração da dose (STORPIRTIS et al., 2009).

O C_{max} representa o máximo da concentração plasmática obtida após administração do fármaco. Para a maioria dos fármacos, existe uma relação entre o efeito farmacodinâmico e

concentração plasmática. Esse parâmetro indica se o fármaco é suficientemente absorvido sistemicamente para prover uma resposta terapêutica ou até mesmo atingir possíveis níveis tóxicos. É expresso em unidades de concentração (mg/mL, ng/mL) (SHARGEL et al., 2004).

O t_{max} corresponde ao tempo requerido para o fármaco alcançar o máximo de concentração após administração. No t_{max} , ocorre o pico de absorção e a taxa de absorção é exatamente igual a taxa de eliminação do fármaco. A absorção do fármaco continua após atingir o t_{max} , porém com uma taxa menor. É expresso em unidade de tempo (horas, minutos) (SHARGEL et al., 2004).

A $t_{1/2}$ mede a taxa de remoção do fármaco absorvido na circulação sistêmica. É o tempo necessário para que as concentrações plasmáticas sejam reduzidas em 50%. É expressa em unidades de tempo (minutos, horas) (SHARGEL et al, 2004).

A eficácia de um medicamento não pode ser atribuída somente as propriedades farmacológicas do fármaco, fatores ligados às suas propriedades físico-químicas, bem como aqueles relacionados aos excipientes empregados na formulação, além do processo de são responsáveis por alterações no efeito dos medicamentos, ou seja qualquer mudança em um desses parâmetros pode afetar a biodisponibilidade do fármaco(PANCHAGNULA; THOMAS, 2000).

2.7.1 Farmacocinética do fluazuron

A dosagem de administração recomendada do fluazuron é de 1,5-2,5 mg/Kg de peso corporal por administração tópica em dose única ou repetida. O produto é aplicado em duas bandas de cada lado da coluna do animal, entre ombros e na garupa. Em geral o controle é obtido em uma única aplicação, quando necessário dependendo da região climática, um tratamento adicional é recomendado depois de 3 a 6 meses. A diferença na dosagem é devido a diferença na sensibilidade do controle de pragas em diferentes países (FAO,1998).

Em estudo realizado, bovinos de corte de raça receberam uma dose de 1,5 mg/Kg de fluazuron por via tópica (Acatack®), e após 16 horas do tratamento fluazuron pode ser observado no plasma, apresentando níveis significativos de 9-35 dias após o tratamento com uma faixa de concentração variando de 0.35-0.41 mg/L.A concentração plasmática decai para 0.007 mg/L 16 semanas após o tratamento. As principais vias de eliminação são pelas fezes (WHO,1997).

Após a administração, o fluazuron é distribuído a todos os tecidos (ZHANG et al., 2013) porém devido a sua lipofilicidade o fluazuron e seus metabólitos possuem uma elevada afinidade pela gordura, sendo acumulado preferencialmente no tecido adiposo, podendo ser transferido e acumulado em bezerros que estão sendo amamentados por vacas em tratamento (FAO,1998).

De acordo com Food Safety Commission do Japão (FSCJ),o fluazuron não apresenta efeito carcinogênico e genotóxico (FSCJ,2010).

A dose diária aceitável de fluazuron é de 0,40 µg/Kg de peso corporal. O comitê FAO/WHO estabeleceu um limite máximo de resíduo de 0,2 mg/Kg em músculo,0,5 mg/Kg em fígado e rim e 7 mg/Kg em gordura (WHO,1997).

Luxinlun et al., 2011, realizou um estudo de farmacocinética com uma formulação de fluazuron subcutânea com aplicação em bovinos. Os animais foram divididos em dois grupos, um grupo recebeu a dose de 1,5 mg/Kg e outro a dose de 3 mg/Kg de peso corporal. Os resultados mostraram uma absorção lenta do fluazuron, com pouco mais da metade do tempo de eliminação. A curva de concentração plasmática foi descrita como um modelo de compartimento único, com absorção de primeira ordem. Não foi observado diferença entre os parâmetros farmacocinéticos entre o grupo que recebeu a dose de 1,5 mg/Kg e o grupo que recebeu a dose de 3,0 mg/Kg. Através do estudo foi possível determinar os seguintes parâmetros farmacocinéticos: $t_{1/2 Ka}$ (15.800 ± 0.230) h, $t_{1/2 Ke}$ (55.423 ± 1.620) h, $T_{m\acute{a}x}$ (46.168 ± 3.979) h, ASC (8.212 ± 0.178) mg/L.h e $C_{m\acute{a}x}$ (0.066 ± 0.005) mg/L.

Apesar desses relatos, existem poucos estudos formais descritos na literatura para avaliação dos níveis de fluazuron ou dos seus metabólitos no plasma ou amostras de tecido.

O desenvolvimento e validação de um método para determinação de fluazuron em plasma bovino, possibilita a elaboração de um estudo de curva de concentração plasmática a partir da administração de uma formulação de fluazuron, permitindo a avaliação de parâmetros farmacocinéticos, fornecendo informações importantes que podem dar suporte para o desenvolvimento de novas formulações para o controle do carrapato bovino.

2.8 Validação

O método bioanalítico para quantificação de fármacos em matrizes biológicas, geralmente é definido a partir de adaptações de métodos publicados na literatura científica, já que não existem métodos disponíveis em compêndios oficiais. Após o desenvolvimento, várias

etapas que constituem o processo de validação são executadas para demonstrar que o método pode ser utilizado para sua aplicação pretendida. A validação deve demonstrar e assegurar que o método atenda aos critérios estabelecidos por meio de ensaios de seletividade, efeito matriz, efeito residual, linearidade da curva de calibração, precisão e exatidão.

2.8.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método quantificar com exatidão o analito na presença de interferentes existentes na amostra. Esses interferentes podem ser substâncias quimicamente relacionadas com o analito, entre elas isômeros, metabólitos, substâncias endógenas, produtos de degradação, impurezas e outros (CASSIANO et al., 2009).

As recomendações da ANVISA, quando a matriz biológica a ser utilizada for o plasma, a seletividade deve ser avaliada pela análise de no mínimo seis amostras: quatro normais, uma lipêmica e uma hemolisada. As respostas dos picos interferentes no tempo de retenção dos fármacos e do padrão interno devem ser inferiores, respectivamente, a 20 e 5% da resposta na concentração utilizada (CASSIANO et al., 2009).

2.8.2 Efeito residual

O efeito residual também conhecido como *carryover* é o efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito ou PI (Padrão interno) causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente. De acordo com a RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012, devem ser realizadas, no mínimo, 3 (três) injeções da mesma amostra considerada branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma ou mais amostras processadas do LSQ (Limite superior de quantificação). Para a comprovação da ausência do efeito residual, as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ (Limite inferior de quantificação). Enquanto as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5% (cinco por cento) da resposta do PI (ANVISA, 2012).

Caso o efeito residual seja inevitável, procedimentos específicos devem ser adotados na execução do método com o objetivo de controlar seu efeito, evitando que a precisão e a exatidão do método sejam afetadas (ANVISA, 2012).

2.8.3 Efeito matriz

Este efeito ocorre quando interferentes presentes na amostra coeluem com os analitos de interesse, sendo alvo de especulação em métodos bioanalíticos convencionais, como:

CLAE/FL, CLAE/UV, CLAE/EC (detector eletroquímico) e CLAE MS/MS (CASSIANO et al., 2009). O objetivo principal não está apenas em ter a melhor eficiência de extração do analito e sim extrair a menor quantidade de interferentes da matriz. Muitas vezes, o que é apresentado como um excelente sinal analítico está mascarado por componentes da matriz.

Através deste ensaio garante-se que, mesmo não obtendo a melhor recuperação, não há nenhum componente da matriz influenciando a análise. Devem ser analisadas amostras de matrizes biológicas processadas (brancos), posteriormente adicionadas de concentrações definidas de analitos e PI, e analitos em soluções, nas mesmas concentrações. Deverão ser avaliados 8 (oito) CQB (Controle de qualidade de baixa concentração) e 8 (oito) CQA (Controle de qualidade de alta concentração), sendo: 4 (quatro) plasmas normais, 2 (dois) plasmas lipêmicos e 2 (dois) plasmas hemolisados para cada concentração. Essas amostras serão comparadas com as respectivas soluções, utilizando o Fator Matriz Normalizada por PI (FMN), calculado segundo a seguinte fórmula:

$$FMN = \frac{\text{Resposta do analito em matriz} / \text{Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução} / \text{Resposta do PI em solução}} \quad \text{Equação 8}$$

O Coeficiente de variação entre todos os FMN não pode ser superior a 15% (BRASIL, 2012).

2.8.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação é definido como a menor concentração do analito que pode ser quantitativamente detectado com valores aceitáveis de precisão e exatidão.

O LIQ é estabelecido através da análise de amostras branco adicionadas do analito, em concentrações decrescentes, até se obter níveis que sejam quantificáveis com precisão e exatidão (ANVISA, 2003).

O limite de quantificação do método é determinado a partir da razão sinal/ruído igual a 10, no tempo de retenção do analito (ANVISA, 2003).

2.8.5 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) é definido como a menor concentração de um analito que o método é capaz de diferenciar confiavelmente do ruído de fundo. É importante ressaltar que

esta concentração é detectada com segurança porém, em contrapartida, não pode ser quantificada (ANVISA, 2003).

O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável (ANVISA, 2003).

O limite de detecção do método é determinado a partir da razão sinal/ruído igual a 3, no tempo de retenção do analito (ANVISA, 2003).

2.8.6 Curva de calibração

A curva de calibração corresponde ao modelo matemático que estabelece uma relação entre a resposta instrumental e a concentração conhecida do analito, devendo ser analisada com base em três curvas de calibração (ANVISA, 2012).

O modelo de calibração deve ser construído a partir da análise de, no mínimo, 6 (seis) concentrações conhecidas do analito (padrões de calibração) adicionadas na mesma matriz biológica proposta para o estudo. Além disso, cada curva deve incluir a análise da amostra branco (matriz biológica isenta de padrão do analito e do padrão interno) e da amostra zero (matriz biológica adicionada de padrão interno) (ANVISA, 2012).

Os resultados devem ser analisados por métodos estatísticos apropriados sendo recomendável o modelo matemático mais simples, geralmente o linear. Caso a variância do erro não seja constante em toda a faixa de quantificação do método analítico, deve ser utilizada a ponderação que apresentar o menor valor para soma dos erros relativos dos valores nominais dos padrões de calibração versus seus valores obtidos pela equação da curva (ANVISA, 2012). Os critérios de aceitação da curva de calibração são:

- Desvio menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração;
- Desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o LIQ;
- No mínimo 75% dos padrões da curva de calibração devem cumprir com os critérios anteriores, incluindo o LIQ e a maior concentração da curva de calibração;
- No mínimo 6 (seis) padrões de calibração de concentrações diferentes, incluindo LIQ e LSQ, aprovados conforme os critérios anteriores (ANVISA, 2012).

Recomenda-se que o coeficiente de correlação linear (r) seja igual ou superior a 0,98 (ANVISA, 2003).

2.8.7 Precisão

A primeira etapa para a verificação da confiabilidade de uma análise é investigar se a mesma se repete quando operada de forma sequencial. Essa operação de repetição denomina-se precisão (LEITE, 2008).

Este parâmetro é avaliado utilizando-se, pelo menos, 5 (cinco) níveis de concentrações (CQ-LIQ, CQB, CQM (controle de qualidade de concentração média), CQA e CQD (Controle de qualidade de diluição)) que contemplem a faixa de variação do procedimento analítico, sendo necessário no mínimo, 5 (cinco) replicatas para cada nível de concentração. A precisão deve ser determinada em uma mesma corrida (precisão intra-corrída) e em, no mínimo, 3 (três) corridas em dias diferentes (precisão inter-corrídas) (ANVISA, 2012). A precisão pode ser expressa em termos da característica da dispersão dos resultados, ou seja, através do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%) (ANVISA, 2012; KOLLIPARA et al., 2011). Como valores de referência não se admitem variações superiores a 15%, exceto para o LIQ, onde se admite valores menores ou iguais a 20%, calculados conforme a fórmula a seguir:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP} \times 100}{\text{Concentração média experimental}} \quad \text{Equação 9}$$

Em que o DPR é o desvio padrão relativo, DP é o desvio padrão e CME, a concentração média experimental (ANVISA, 2012).

2.8.8 Exatidão

A exatidão de um método bioanalítico é a proximidade entre o valor aceito como verdadeiro ou de referência em relação ao valor encontrado experimentalmente. A exatidão pode ser expressa como % erro ou % nominal (KOLLIPARA et al., 2011).

Este parâmetro é determinado em pelo menos 5 (cinco) níveis de concentração (CQLIQ, CQB, CQM, CQA e CQD) em cinco replicatas cada. Deve ser avaliado em uma mesma corrida analítica (exatidão intra-corrída), e também em, no mínimo, três corridas analíticas em dias diferentes (exatidão inter-corrídas). A exatidão é expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), não se admitindo valores fora da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ, para o

qual não se admitem valores fora da faixa de $\pm 20\%$ do valor nominal, segundo a fórmula a seguir (ANVISA, 2012):

$$EPR = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}) \times 100}{\text{Valor nominal}} \quad \text{Equação 10}$$

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Equipamentos e acessórios

- Agitador de tubos modelo MX-S (Gomixer, Rocky Hill, USA);
- Balança analítica modelo B-TEC-210A (Tecnal, São Paulo, Brasil);
- Bomba à vácuo modelo TE-0581 (Tecnal, São Paulo, Brasil);
- Cartuchos de EFS C18 Discovery® DSC-18LT - 3mL; 500 mg (Sigma Aldrich/Supelco, Bellefonte, Pensilvânia);
- Cartuchos vazios de EFS com capacidade de 3 mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA);
- Centrífuga modelo CT-6000R (Cientec, Belo Horizonte, Brasil)
- Coluna cromatográfica fase reversa Kromasil C₁₈ 250 x 4 mm, 5 µm (Tedia, Rio de Janeiro, Brasil);
- Coluna de guarda de mesma fase estacionária 10 x 4,6 mm, 5 µm (Tedia, Rio de Janeiro, Brasil);
- Concentrador de amostras modelo TE0197 (Tecnal, São Paulo, Brasil)
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao detector de UV/VIS modelo Ultimate 3000 (Dionex, Califórnia, USA) composto por um sistema de bombeamento quaternário, amostrador automático, compartimento de coluna controlado por temperatura. A aquisição de dados foi realizada pelo programa Chromeleon versão 6.8 (Dionex, Califórnia, USA);
- Filtros de polietileno 20µm para cartucho de EFS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA);
- Lavadora ultrassônica modelo USC-2800 (Unique, Indaiatuba, Brasil);
- Manifold à vácuo com capacidade para 12 cartuchos Visiprep (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA);
- Ultrapurificador Master P&d acoplado ao sistema de purificação por osmose reversa OS 10 LZ (Gehaka, São Paulo, Brasil);
- Filtro Millex-HV para seringa de 0.45 µm PVDF (Millipore, USA)
- Tubos de coleta de heparina sódica de 10 mL (BD);

3.1.2 Reagentes e padrões

- Acetato de Etila P.A. (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil);
- Acetonitrila grau HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA);
- Metanol grau HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA);
- Diclorometano grau HPLC (Tedia);
- Hexano grau HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA);
- Éter Dietílico P.A. (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil);
- Fluazuron Pestanal® Lote SZBA013XV – Material de referência (Sigma-Aldrich, Estugarda, Alemanha);
- Fluazuron Baoray Lote 20070051819 – Matéria prima (Baoray, Shanghai, China);
- Clorfluazuron Pestanal® Lote: SZBA204XV – Material de referência (Sigma-Aldrich, Estugarda, Alemanha);
- C₁₈Discovery® (50 µm, 70 Å) (Sigma Aldrich/Supelco, Bellefonte, Pensilvânia);
- Sulfato de magnésio anidro (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA);
- Florisil < 200 mesh (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA);

3.2 Métodos

3.2.1 Localização da experimentação

Os experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) do Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Os animais que foram utilizados foram mantidos na fazenda experimental desta instituição.

3.2.2 Preparo de soluções e amostra

3.2.2.1 Soluções estoque

Foram preparadas duas soluções estoque, uma de fluazuron e a outra de clorfluazuron (PI), para tanto foi pesado 25 mg de fluazuron e transferido para outro balão volumétrico de 25,00 mL e 5 mg de clorfluazuron e transferido para balão volumétrico de 5mL. O volume dos balões foi completado com ACN.

As soluções foram transferidas para frascos âmbar e armazenadas a temperatura ambiente por até 7 (sete) dias.

3.2.2.2 Soluções de trabalho

As soluções de trabalho para contaminação do plasma usada na otimização e validação do método foram preparadas na concentração de 5000 ng/mL, para cada analito. As soluções foram preparadas pela diluição da solução estoque (1 mg/mL) em ACN.

3.2.2.3 Amostras de controle de qualidade

O sangue foi coletado de bovinos que não foram submetidos a tratamento com antiparasitários por um período de no mínimo três meses. Para a coleta do sangue foram utilizados tubos heparinizados de 10 mL com vácuo. Os animais foram contidos e o sangue coletado através de punção venosa profunda da jugular. O plasma foi obtido através de centrifugação a 3000 rpm por 10 min a 4°C. Para o preparo das amostras utilizadas no estudo comparativo dos métodos de extração, plasma foi contaminado com solução de trabalho contendo FLU para obtenção de concentração final de 140ng/mL. A solução de trabalho do clorfluazuron (PI) foi adicionado ao plasma para obtenção de concentração final de 70 ng/mL. Após a contaminação, o plasma foi aliqotado em volumes de 1,00 mL em eppendorfs e acondicionado em freezer (-20°C) até o momento da análise. Na tabela 3 e tabela 4 consta a preparação das amostras de controle de qualidade utilizadas na validação da metodologia.

Tabela 3 – Preparação das amostras para avaliação efeito matriz

Ponto	C _{ST} FLU (ng/mL)	Alíquota (µL)	C _{ST} PI (ng/mL)	Alíquota (µL)	Vol. ACN (µL)	C _F Flu (ng/mL)	C _F PI (ng/mL)
CQB	5000	10	5000	140	850	50	70
CQA		120		140	740	120	70

C_{ST} – concentração da solução de trabalho; C_F – concentração final; CQA – amostra de controle de qualidade de alta concentração; CQB – amostra de controle de qualidade de baixa concentração; FLU – fluazuron e PI – padrão interno.

Tabela 4 – Preparo de amostras para curva analítica, precisão e exatidão.

Ponto (ng/mL)	C _{ST} FLU (5000 ng/mL)	C _{ST} PI (5000 ng/mL)	Vol. plasma (mL)	C _F FLU (ng/mL)	C _F PI (ng/mL)
	Alíquota (mL)	Alíquota (mL)			
20 (LIQ)	0.0200	0.0700	10.0	10.0	
50 (CQB)	0.110	0.154	22.0	25.0	
70 (CQM)	0.0700	0.0700	10.0	35.0	
100	0.0600	0.0420	6.00	50.0	35.0
120 (CQA)	0.0720	0.0420	6.00	60.0	
150 (LSQ)	0.330	0.154	22.0	75.0	
Zero	-	0.0210	3.00	150	

C_{ST} – concentração da solução de trabalho; C_F – concentração final; CQA – amostra de controle de qualidade de alta concentração; CQB – amostra de controle de qualidade de baixa concentração; CQM – amostra de controle de qualidade de média concentração; LIQ – amostra de limite inferior de quantificação; LSQ – amostra de limite superior de quantificação FLU – fluazuron e PI – padrão interno.

3.2.3 Métodos de extração

O procedimento de extração do fluazuron do plasma foi avaliado preliminarmente quanto à porcentagem de recuperação alcançada, à precisão e seletividade.

3.2.3.1 Extração líquido-líquido

Escolha do solvente extrator

Foram avaliados quatro tipos de solventes (acetato de etila, diclorometano, éter dietílico e hexano) para o procedimento de extração. Foi adicionado à 1 mL de plasma, 1 mL de solvente. A mistura foi homogeneizada em vórtex por 1 min, no modo máximo de agitação, em seguida centrifugada a 6000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi filtrado e evaporado até *secura* sob temperatura de 35°C em um sistema à vácuo e ressuspensionado em 500 µL de ACN. A quantificação foi realizada por CLAE-UV.

Otimização intensidade da homogeneização

Foram avaliados dois tipos de intensidade de agitação do vórtex: média e alta. A mistura foi homogeneizada em vórtex por 1 min, em dois modos de agitação, em seguida centrifugada a 6000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi filtrado e evaporado até *secura* sob temperatura de 35°C em um sistema à vácuo e ressuspensionado em 500 µL de ACN. A quantificação foi realizada por CLAE-UV.

3.2.3.2 Microextração Dispersiva Líquido-Líquido

Em uma alíquota de plasma contaminado (70 ng/mL) foi adicionado 3.2 mL ACN (solvente dispersor) a mistura foi homogeneizada em vórtex por 1 min, no modo máximo de agitação, em seguida centrifugada (6000 rpm, 15 min). Ao sobrenadante foi adicionado 220 µL de diclorometano (solvente extrator) e 4,5 mL de H₂O filtrado. A mistura foi levada ao ultrassom por 5 minutos e logo após a centrifugação. A quantificação foi realizada em CLAE-UV.

3.2.3.3 Extração em fase sólida

Foram avaliados cinco tipos de eluentes (acetato de etila, acetonitrila, diclorometano, éter dietílico e hexano) para o procedimento de extração. Para tal foram utilizados cartuchos de extração de fase reversa (C₁₈) acoplados a um *manifold* com capacidade para 12 cartuchos ligados a uma bomba à vácuo a 15 mm de Hg. Antes de cada extração, os cartuchos foram condicionados com 2 mL de metanol e 2 mL de água, com o cuidado para não secar a fase sólida. Uma alíquota de 1 mL de plasma fortificado com 70 ng de fluazuron e PI foi percolada pelos cartuchos. Os cartuchos foram lavados com 1 mL de água, e o sistema foi submetido a um aumento de pressão de vácuo para a total eliminação da água e então, os analitos foram eluídos do cartucho com 1 mL de eluente. Após eluição o resíduo de água foi retirado com o auxílio de uma seringa com agulha. O eluato foi evaporado até à secura sob temperatura de 35°C em um sistema à vácuo e ressuspendido em 500 µL de ACN. A quantificação foi realizada por CLAE-UV.

3.2.3.4 Dispersão de matriz em fase sólida

Diversos experimentos foram realizados variando os parâmetros para a otimização do processo de extração e limpeza, utilizando DMFS. O adsorvente utilizado na DMFS foi previamente acondicionado com 1 mL de metanol e posteriormente com 1 mL de água.

Otimização da etapa de clean-up utilizando florissil

A metodologia inicial foi baseada no trabalho realizado por (MAFFEI, 2009), onde 0,125 mL de plasma fortificado com a solução de trabalho dos padrões analíticos, 0,5 mg de C₁₈ e 0,5 mg de Mg₂SO₄ foram homogeneizados em almofariz por 2 min, sendo o conteúdo empacotado em cartucho de EFS de polietileno de 3 mL entre dois *frits* de polietileno contendo proporção variável de florissil (0 mg, 125 mg, 250 mg e 500 mg) pré-ativado com 1 mL de

acetonitrila. O eluato foi evaporado até à secura sob temperatura de 35°C em um sistema à vácuo e ressuspendido em 500 µL de ACN. A quantificação foi realizada por CLAE-UV.

Otimização da etapa de clean-up utilizando água

Nesta etapa 0,125 mL de plasma fortificado com a solução de trabalho dos padrões analíticos, 0,5 mg de C₁₈ e 0,5 mg de Mg₂SO₄ foram homogeneizados em almofariz por 2 min, sendo o conteúdo empacotado em cartucho de polietileno de 3 mL entre dois *frits* de polietileno. Antes da etapa de eluição, os cartuchos foram lavados com 1 mL de água, e o sistema foi submetido a um aumento de pressão de vácuo para a total eliminação da água e então, os analitos foram eluídos do cartucho com 1 mL de eluente. Após eluição o resíduo de água foi retirado com o auxílio de uma seringa com agulha. O eluato foi evaporado até à secura sob temperatura de 35°C em um sistema à vácuo e ressuspendido em 500 µL de ACN. A quantificação foi realizada por CLAE-UV.

O mesmo procedimento foi repetido excluindo a etapa de lavagem com água para fins de comparação.

Otimização da proporção amostra: adsorvente

Após definir a etapa de limpeza do método, verificou-se a influência da proporção da mistura (amostra: adsorvente) na recuperação do analito. Para isso 0,125 mL de plasma fortificado com a solução de trabalho dos padrões analíticos foi homogeneizado na proporção 1:2, 1:3 e 1:4 de C₁₈ separadamente e 0,5 mg de Mg₂SO₄ foram homogeneizados em almofariz por 2 min, sendo o conteúdo empacotado em cartucho de EFS de polietileno de 3 mL entre dois *frits* de polietileno. Os cartuchos foram lavados com 1 mL de água, e o sistema foi submetido a um aumento de pressão de vácuo para a total eliminação da água e então, os analitos foram eluídos do cartucho com 1 mL de eluente. Após eluição o resíduo de água foi retirado com o auxílio de uma seringa com agulha. O eluato foi evaporado até à secura sob temperatura de 35°C em um sistema à vácuo e ressuspendido em 500 µL de ACN. A quantificação foi realizada por CLAE-UV.

3.3 Método Analítico

3.3.1 Condições cromatográficas

- Sistema Cromatográfico: CLAE Dionex Ultimate 3000;
- Pré-coluna: Kromasil – C18 (5 µm) 10x4,6 mm;
- Coluna: Kromasil – C18 (5 µm) 250x4,6 mm;
- Comprimento de onda: 260 nm
- Fluxo: 1,00 mL/min
- Volume de injeção: 20 µL
- Temperatura: 25°C
- Tempo de corrida: ELL – 25 min; EFS – 15 min e DMFS – 20 min.

3.4 Validação do Método de Extração de Fase Sólida

Para a validação do método EFS para a determinação de fluazuron em plasma bovino foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, efeito residual, efeito de matriz, linearidade, precisão, exatidão baseada na (ANVISA, 2012) e o limite de detecção e limite de quantificação baseada na (ANVISA, 2003).

3.4.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas obtidos na análise de seis amostras branco (quatro normais, um lipêmico e um hemolisado) e para amostra de controle de qualidade de LIQ fortificada com fluazuron (20 ng/mL), com o objetivo de avaliar a eventual presença de interferentes da matriz próximo ao tempo de retenção do analito e do PI que pudessem comprometer a determinação dos fluazuron.

3.4.2 Efeito residual

Para avaliar o efeito residual, foi feita a extração de uma amostra branco e esta foi injetada no cromatógrafo. Em seguida, uma amostra de plasma com fluazuron na concentração do limite superior de quantificação (LSQ) foi extraída e injetada no cromatógrafo, seguida de duas injeções da amostra de plasma branco.

3.4.3 Efeito matriz

Para avaliação do efeito de matriz, foram utilizadas oito amostras de plasma diferentes, sendo quatro normais, dois lipêmicos e dois hemolisados. Utilizaram-se 1mL de cada amostra de plasma, sendo cada amostra extraída separadamente segundo o método descrito. Após a

extração e concentração da amostra foi feita a contaminação da amostra extraída, de modo a obter concentrações semelhantes ao CQB e ao CQA, separadamente.

3.4.4 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada por meio da construção de três curvas analíticas contendo 6 concentrações do fluazuron em dias distintos. A área do analito foi relacionada com a área do padrão interno (clorfluazuron).

Em cada dia de análise, foram realizadas extrações de plasma branco e extrações de plasma branco adicionadas de padrão interno. As amostras de controle de qualidade foram utilizadas para avaliação da precisão e exatidão, como descrito a seguir. Para a avaliação da curva analítica, foram considerados os desvios dos pontos em relação à concentração nominal.

3.4.5 Limite de detecção

O limite de detecção do método para a determinação do FLU em plasma foi determinado a partir da razão sinal/ruído igual a 3. Para tanto, foram fortificadas amostras branco com concentrações decrescentes de FLU.

3.4.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação do método para a determinação do FLU em plasma foi determinado a partir da razão sinal/ruído igual a 10. Para tanto, foram fortificadas amostras branco com concentrações decrescentes de FLU.

3.4.7 Precisão e exatidão

A precisão do método foi avaliada em três dias consecutivos por meio da análise, em quintuplicata, das amostras do limite inferior de quantificação (LIQ), controle de qualidade na concentração baixa (CQB), controle de qualidade na concentração média (CQM), controle de qualidade na concentração alta (CQA) e controle de qualidade de diluição (CQD).

3.5 Aplicabilidade do Método

Toda parte experimental envolvendo os ensaios in vivo com os bovinos foram realizados na fazenda experimental da UFRRJ.

Foram usados três bezerros da raça Red Angus, com peso corporal entre 357 e 448 Kg. Durante todo o período experimental (35 dias) os animais permaneceram em piquetes individuais. Foram realizadas 8 (oito) coletas de sangue, 24, 48 e 72 hs, 7, 14, 21, 28 e 35 dias.

No dia do tratamento os animais foram pesados para calcular o volume da formulação tópica comercial de fluazuron (Acatack®) a ser aplicada, na dose de 2.5 mg/Kg de peso corporal correspondendo ao volume de 1mL/10 Kg.

Os dados brutos obtidos foram relacionados com os parâmetros da curva de calibração ponderada para determinação da concentração experimental de cada tempo de coleta.

4 RESULTADOS

4.1 Métodos de Extração

Os procedimentos de extração foram avaliados preliminarmente quanto a porcentagem de recuperação, exatidão alcançada e seletividade. Alguns ajustes foram feitos em cada método a fim de que os parâmetros citados fossem satisfatórios.

4.1.1 Extração líquido-líquido

A escolha dos solventes para otimização do método ELL, foi feita baseada em três parâmetros: no logaritmo do coeficiente de partição do fluazuron (Log P 5,1), esse valor indica uma maior preferência do analito pela fase orgânica do que pela fase aquosa; na solubilidade do solvente orgânico em água (<10%), uma solubilidade maior aumenta o volume da fase aquosa; e na volatilidade do solvente extrator, possibilitando a concentração da amostra, além de não ser necessário a compatibilidade do solvente extrator com a técnica analítica empregada (CLAE-U). Com base nesses parâmetros foram escolhidos os solventes descritos na tabela 5.

Tabela 5 – Propriedades físico-químicas dos solventes orgânicos (NCBI, 2016).

Solvente	(%) solubilidade em água - 20° C	Ponto de ebulição (°C,1013 hPa)	Pressão de vapor (mmHg ,20° C)
Acetato de Etila	8.89%	77	93.2
Diclorometano	1.00%	40	435
Éter	8.47%	35	538
Hexano	0.00144%	69	153

Os resultados da figura 6 mostram a relação da eficiência da extração com a intensidade de agitação para cada solvente testado. A intensidade média não permite uma maior interação do solvente extrator com a matriz, ocasionando baixos valores de recuperação. Dentre os solventes analisados o éter apresentou a maior eficiência de extração para o fluazuron e para o PI, conseqüentemente gerando o maior valor de recuperação absoluta e relativa, enquanto o acetato de etila, o diclorometano e o hexano apresentaram menor eficiência de extração para o fluazuron, apresentando baixa recuperação absoluta e não foram capazes de recuperar o PI.

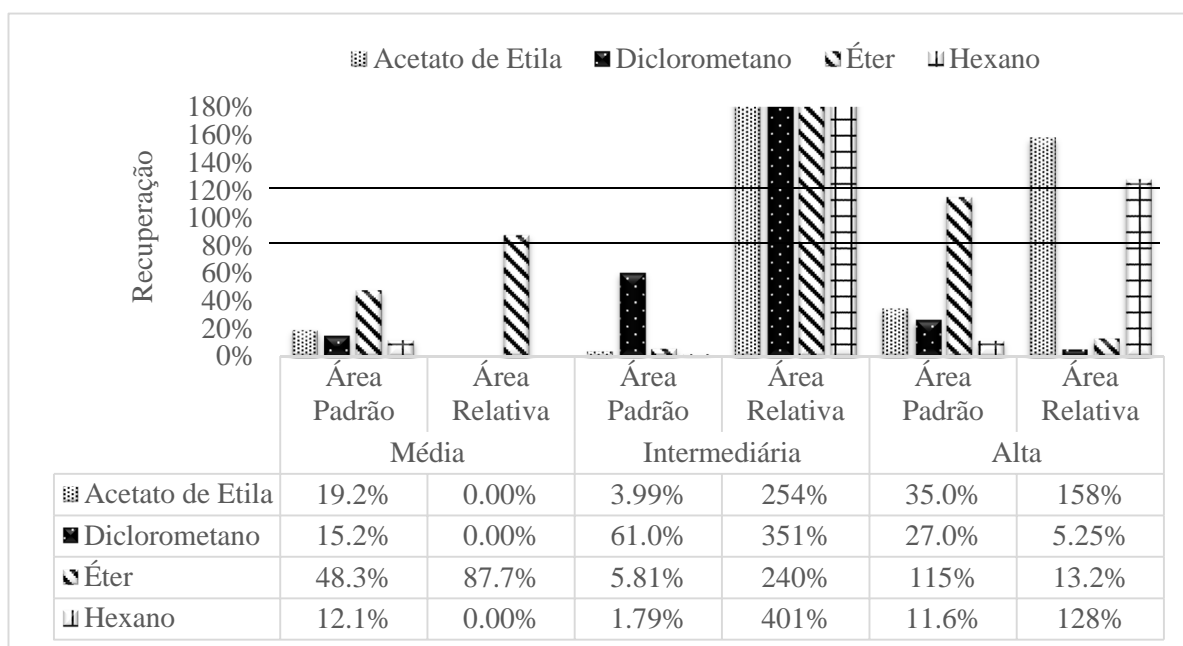


Figura 6 - Gráfico de efeito da intensidade de agitação na eficiência de extração na Extração Líquido Líquido.

Os valores apresentados na intensidade intermediária, mostram uma diminuição de eficiência de extração para o fluazuron apresentando valores menores de recuperação absoluta para éter, diclorometano, acetato de etila e hexano de forma decrescente e altos valores de recuperação relativa para todos os solventes analisados devido a uma pequena recuperação de PI. Pode-se observar que a intensidade de agitação no nível alto, proporcionou um melhor rendimento de extração para o fluazuron com todos os solventes analisados com exceção do diclorometano, onde um houve um decréscimo no valor de recuperação absoluta e um aumento no rendimento de extração do para todos os solventes analisados, gerando valores menores de recuperação relativa. Isto significa que o aumento da agitação da amostra contribui para o aumento na porcentagem de recuperação, devido a uma maior interação entre o solvente extrator e a amostra.

De acordo com os resultados mostrados no gráfico abaixo (Figura 7), nenhum dos solventes avaliados fornecem valores de precisão $\leq 15\%$ e valores de recuperação entre 80-120% conforme preconizado pela legislação (ANVISA, 2003). O uso do PI favoreceu a recuperação relativa do solvente acetato de etila, diclorometano e hexano, porém como a eficiência de extração do PI foi menor do que a do fluazuron ocasionou uma recuperação acima do critério de aceitação. Para o solvente éter o método não é seletivo, apresentando interferentes $> 20\%$ no tempo de retenção do LIQ e do PI.

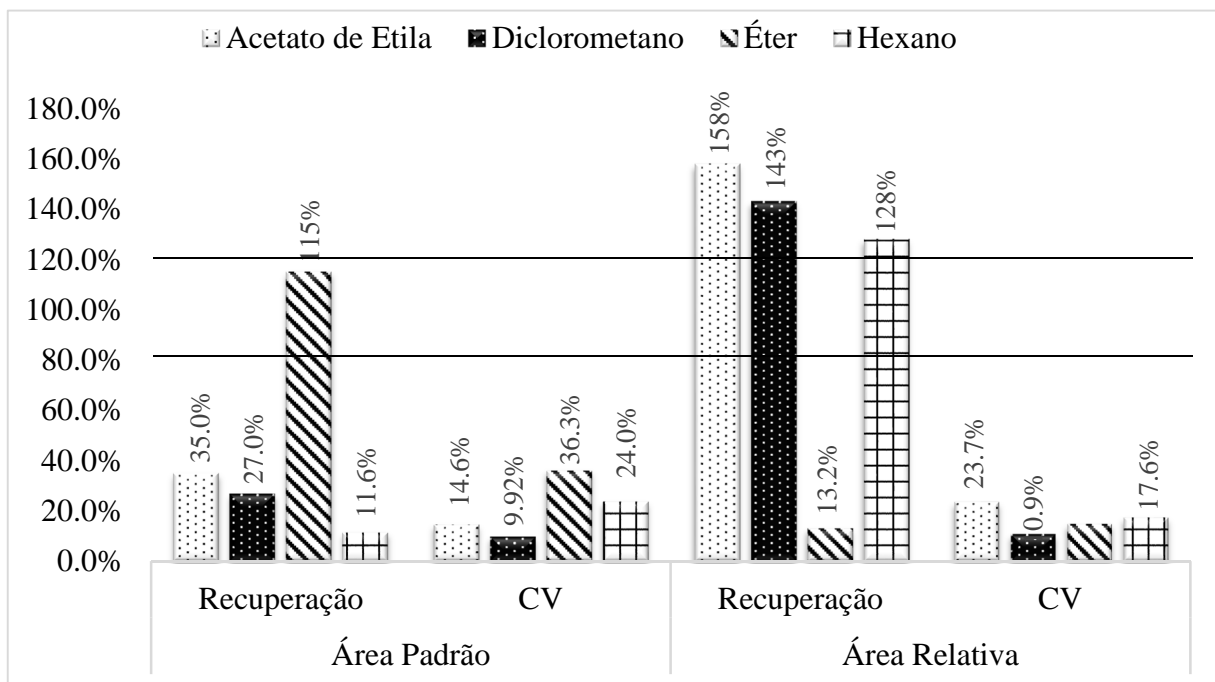


Figura 7 - Resultados de recuperação e precisão absoluta e relativa para os quatro solventes avaliados na Extração Líquido Líquido.

A formação de emulsão com todos os solventes avaliados, dificulta a discussão da influência de cada um dos solventes de acordo com as suas características, influenciando na recuperação e precisão do método.

4.1.2 Extração em fase sólida

A seleção da fase sólida é um fator determinante na EFS, através dela controlamos parâmetros como seletividade, afinidade e capacidade de amostra. A escolha da fase estacionária do método foi feita com base nas propriedades da matriz e do analito. Fase reversa (C18) são compatíveis com matrizes biológicas aquosas como o plasma e são utilizadas para extração de analitos de baixa e média polaridade. A figura 8 ilustra os resultados de precisão e exatidão absoluta e relativa para cada solvente analisado.

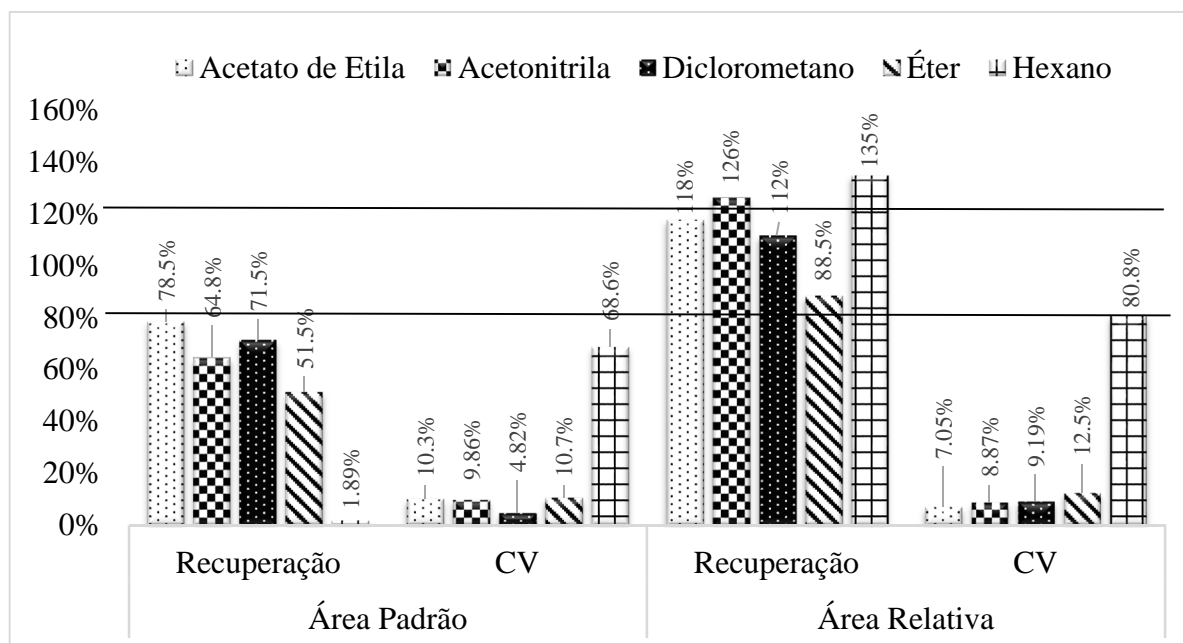


Figura 8-Resultados de exatidão e precisão absoluta e relativa para os cinco solventes avaliados na Extração em Fase Sólida

Em termos de recuperação absoluta, com exceção da acetonitrila o aumento da recuperação é proporcional ao aumento da força eluotrópica (ϵ°), a menor recuperação é obtida com o solvente hexano que apresenta $\epsilon^\circ = 0$ e a maior recuperação para o acetato de etila que possui $\epsilon^\circ = 0,45$. Este comportamento é explicado pela polaridade do fluazuron, um analito com baixa polaridade presente em uma matriz aquosa, sendo a água um solvente com polaridade alta ($\epsilon^\circ = 0,73$), o analito é preferencialmente retido na fase reversa (C_{18}) e para quebrar a interação entre o analito e a fase sólida é necessária o uso de um solvente de baixo ϵ° (LANÇAS, 2004). Considerando a área relativa os três solventes que apresentam valores de precisão $\leq 15\%$ e valores de recuperação entre 80-120% conforme preconizado pela legislação (ANVISA, 2003), são éter ($\epsilon^\circ = 0,29$), diclorometano ($\epsilon^\circ = 0,32$) e acetato de etila ($\epsilon^\circ = 0,45$)

Porém, dentre os três, o acetato de etila apresenta a vantagem de possuir uma menor toxicidade. O hexano e a acetonitrila são solventes que estão nas extremidades da série eluotrópicas. A força eluotrópica do hexano é a menor do grupo fazendo com que coelua substâncias da matriz com menor polaridade, enquanto que a acetonitrila possui a maior força do grupo, fazendo coeluir substâncias com maior polaridade e não tornam o método seletivo ocasionando valores de recuperação acima de 120%. Logo, a seletividade é um importante parâmetro a ser avaliado na escolha do solvente a ser utilizado no método de extração (CASSIANO et al., 2009). Os valores observados de precisão na EFS, foram menores do que

os apresentados na ELL. A precisão está diretamente relacionada com a manipulação da amostra, na EFS diminuimos as etapas de manipulação, e conseqüentemente diminuimos o CV, além de não ter a formação de emulsão que é um fator que influencia na precisão do método. Os valores de precisão para EFS foram satisfatórios para quatro dos cinco solventes: acetato de etila, éter dietílico, diclorometano e acetonitrila.

Apesar dos dados de recuperação relativa serem numericamente diferentes, pelo teste anova e pelo teste tukey realizado pelo software Minitab mostra que eles são estatisticamente iguais ($p=0,419$).

A solvente de escolha para eluição do analito, acetato de etila apresentou 118% de recuperação relativa e 7,05% de CV, esses valores estão dentro dos critérios estabelecidos pela legislação. Além disso, dentre os três solventes (acetato de etila, diclorometano e éter) que apresentaram valores dentro da faixa de aceitação, o acetato de etila é o que apresenta menor toxicidade, gerando um menor impacto ambiental e menor risco para o analista.

4.1.3 Dispersão de matriz em fase sólida

Neste método foram avaliados os parâmetros: quantidade de adsorvente para etapa de *clean-up* (florisil), solvente para etapa de *clean-up* (H_2O) e quantidade de adsorvente dispersante (C_{18}). O acetato de etila foi definido como o melhor solvente utilizado para eluição, durante a otimização do método de EFS.

A proporção e o tipo de agente secante utilizado na DMFS, não foi otimizada pois a quantidade utilizada inicialmente foi suficiente para reter a água, impedindo a formação de duas fases no extrato. Esse fator se deve ao alto poder de hidratação do sulfato de magnésio (MARTINS et al., 2012).

O primeiro parâmetro a ser avaliado na DMFS foi a etapa de *clean-up*. Foram avaliadas quatro condições de preparo da amostra: sem adição de florisil (adsorvente *clean-up*), e com adição de 125, 250 e 500 mg de florisil. Foi realizada uma comparação para avaliação da quantidade mínima de adsorvente e melhor limpeza do extrato.

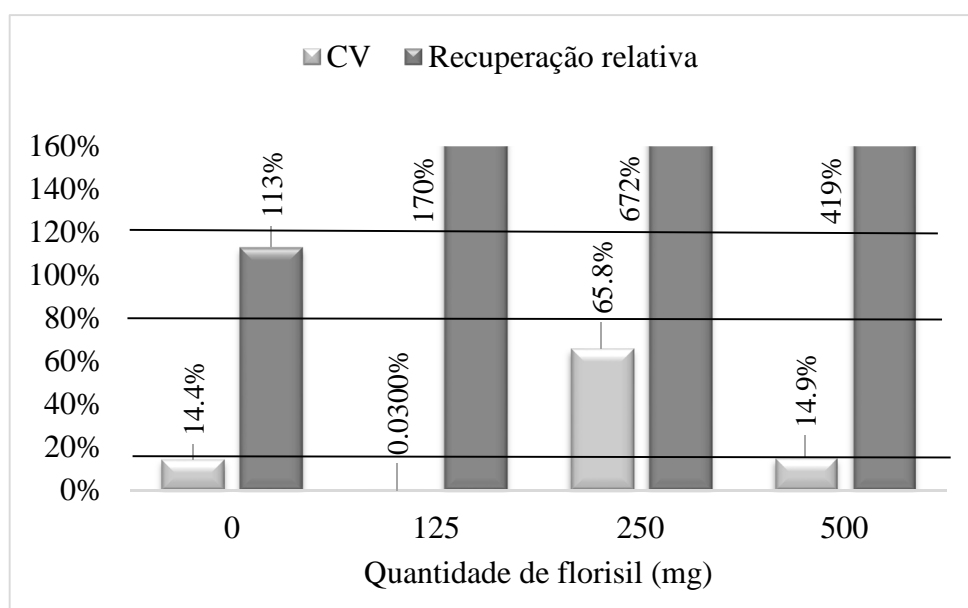


Figura 9 - Resultados de recuperação e precisão de acordo com a quantidade de florisil utilizada na etapa de *clean-up* para DMFS.

De acordo com os resultados descritos no gráfico abaixo (Figura 9), o adsorvente florisil, não desempenha o papel de limpeza do extrato e ocasiona altos valores de recuperação relativa, devido a uma baixa recuperação absoluta do PI.

Como alternativa de *clean-up* do extrato, o adsorvente florisil foi substituído a lavagem do extrato com H₂O. A escolha da H₂O como solvente de lavagem é devido ao fato de sua força eluotrópica ser menor, não sendo capaz de quebrar a interação do analito com a fase sólida. A tabela 6 demonstra a comparação dos resultados de recuperação e precisão absoluta e relativa com e sem a utilização de água na etapa de *clean-up*.

Tabela 6 – Resultados de recuperação e precisão (CV) utilizando a água na etapa de *clean-up* do extrato na Dispersão de Matriz em Fase Sólida.

	Área absoluta		Área relativa	
	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
c/ H ₂ O	33.4	7.7	110	13.5
s/ H ₂ O	86.5	19.1	119	6.7

Os resultados sem a lavagem do extrato com H₂O, ou seja, sem a etapa de *clean-up* foram satisfatórios quando comparado a lavagem do extrato com H₂O, a etapa adicional de *clean-up* provoca uma perda do analito, ocasionando baixos valores de recuperação absoluta.

Após eliminação da etapa de clean-up, foi avaliada a quantidade de massa de fase dispersante, avaliando a quantidade mínima necessária para melhor limpeza do extrato sem interferir na exatidão e precisão do método.

O último parâmetro otimizado na DMFS, foi a quantidade de fase dispersante. A quantidade do adsorvente de dispersão tem um efeito sobre a recuperação do método. Sendo a matriz o plasma, um líquido viscoso, quanto menor for a quantidade de adsorvente, mais viscosa a mistura se torna sendo mais difícil a dispersão dos analitos. O efeito da quantidade da fase dispersante sobre as recuperações foi avaliado, os resultados são mostrados na tabela 7 .

Tabela 7 -Resultados de recuperação e precisão (CV) para avaliação de três proporções de amostra: adsorvente na DMFS.

Amostra: Adsorvente	Área absoluta		Área relativa	
	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
1:2	65.2	30.7	125	6.78
1:3	75.9	10.7	102	5.97
1:4	86.5	19.1	119	6.69

É possível observar que um aumento da quantidade de adsorvente provoca uma maior eficiência de extração do fluazuron. As proporções 1:3 e 1:4 geraram resultados de precisão e exatidão satisfatórios considerando a área relativa. Porém a proporção 1:4 oferece uma maior eficiência de extração para o fluazuron e em contrapartida uma menor eficiência de extração do PI, elevando o valor de recuperação relativa. Como o analito alvo do presente estudo é o fluazuron, a proporção 1:4 é a escolhida para realização da DMFS. De acordo com a literatura a relação típica é que a quantidade de amostra seja 4 vezes menor que a quantidade de adsorvente, para que a mistura seja pulverulenta e não pastosa, permitindo a melhor penetração do eluente no material. (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

4.1.4 Microextração líquido-líquido dispersiva

Não foi possível atingir o equilíbrio de partição nesta técnica, pois o fluazuron não foi determinado. A velocidade de agitação utilizada não foi suficiente para a sedimentação do solvente extrator, dificultando a retirada do extrato.

Um dos parâmetros mais importantes no desenvolvimento da MELL, é o tempo de extração que é definido pelo intervalo entre a injeção da mistura dos solventes extrator e dispersor na fase aquosa e o final da centrifugação.

4.1.5 Comparação da EFS e DMFS

Após a otimização de cada método, foi possível definir o melhor método a ser utilizado para extração de fluazuron do plasma bovino.

A ELL mostrou-se um método não seletivo e não oferece valores de precisão e exatidão conforme preconizado pela legislação (ANVISA, 2012). Além disso na ELL, o extrato obtido é mais “sujo” que dos demais métodos sendo necessário um maior tempo de análise (Figura 10) para eliminação de todos os interferentes, gerando um custo maior e um maior impacto ambiental, devido a elevada quantidade de solvente utilizado.

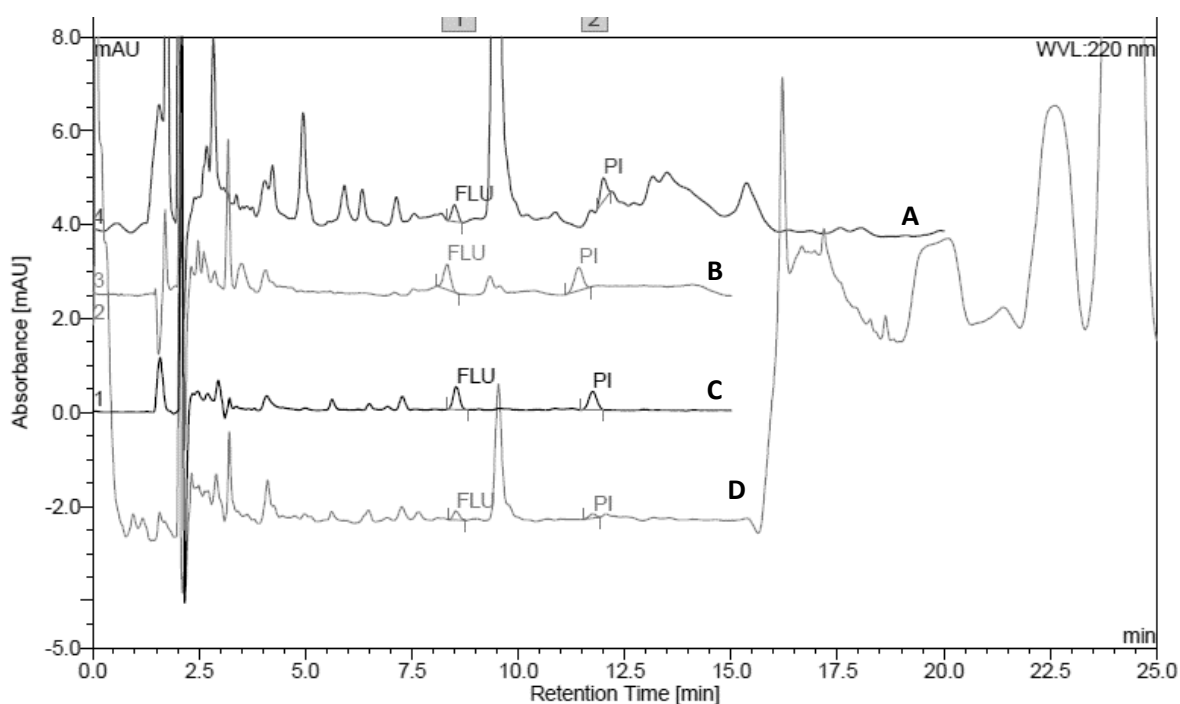


Figura 10 - Cromatograma comparativo dos três métodos avaliados e do padrão (C) com concentração idêntica das amostras: dispersão de matriz em fase sólida (A), extração em fase sólida (B) e extração líquido-líquido (D)

O método de DMFS e EFS, ofereceram os melhores resultados dos três parâmetros avaliados, e seus dados foram comparados entre si estatisticamente.

A análise estatística dos dados foi feita pelo teste anova realizado pelo software Minitab, através dele provamos que não há diferença estatística ($p > 0,05$) entre os dois métodos (EFS e DMFS).

Embora estatisticamente os dois métodos sejam iguais, a avaliação de custo e praticidade define o melhor método.

Na DMFS existe um maior número de etapas de preparo da amostra, fazendo com que haja um maior gasto de tempo comparado a técnica de EFS. E pensando em estudos farmacocinéticos, onde há uma grande quantidade de amostras a serem processadas, a EFS se torna um método mais viável.

Apesar da DMFS no presente estudo ter apresentando resultados de recuperação satisfatórios existe uma preocupação com caminhos preferenciais durante o preenchimento do cartucho com o extrato, prejudicando a recuperação do analito, esse fator não ocorre na EFS pois o cartucho já vem preenchido com a fase sólida (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Como já discutido anteriormente o processo de preparo de amostras é uma das etapas que demandam maior tempo, e pensando em um laboratório que realiza estudos de biodisponibilidade e bioequivalência, gerando um grande número de amostras a serem processadas, um método ideal é um método rápido e que possua algum grau de automatização. A EFS possui 4 etapas (condicionamento da fase, carregamento da amostra, lavagem e eluição), enquanto a DMFS possui 3 (condicionamento do adsorvente, preparo do extrato, preenchimento do cartucho com o extrato e a eluição), entretanto o tempo gasto no preparo da DMFS é maior do que na EFS. Apesar da EFS e DMFS terem o mesmo gasto na etapa de preparo de amostra, na fase da análise dos eluatos a DMFS gera um gasto maior devido o maior tempo necessário para eliminação de interferentes, 20 minutos, enquanto na EFS o tempo gasto é de 15 min.

4.2 Validação do Método de Extração Fase Sólida

Uma vez otimizado o procedimento de preparo de amostras, a EFS foi utilizada para validação do método analítico para a determinação de fluazuron em amostras de plasma bovino por CLAE-UV.

4.2.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada no presente estudo pela comparação dos cromatogramas obtidos para amostras branco de plasma bovino e amostras branco fortificadas com FLU, conforme apresentados na Figura 11.

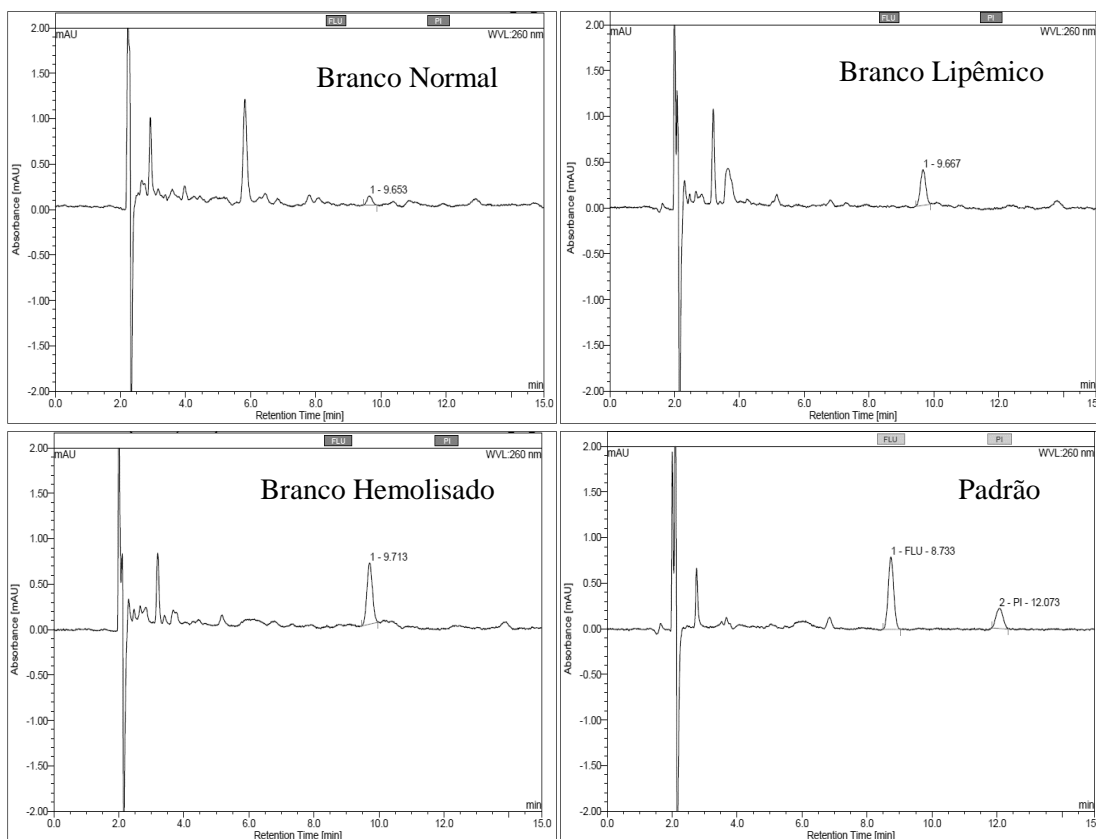


Figura 11 – Cromatograma das amostras branco (plasma isento de fluazuron e padrão interno) utilizadas para avaliar o parâmetro seletividade.

Os resultados obtidos demonstram que o método é seletivo para determinação do fluazuron e o padrão interno no plasma bovino, uma vez que as respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do analito foi de 7.49% (< 20% resposta do LIQ na amostra processada) e não apresentou nenhuma resposta de interferente no tempo de retenção do PI.

Tabela 8 - Porcentagem em relação a área do LIQ para fluazuron e em relação a área do PI de interferentes no tempo de retenção de cada um dos analitos.

Amostra	Tipo	% de interferente no tempo de retenção do Analito	% de interferente no tempo de retenção do PI
1	Branco	7.49%	0.00%
2	Branco	7.49%	0.00%
3	Branco	0.00%	0.00%
4	Branco	0.00%	0.00%
5	Lipêmica	0.00%	0.00%
6	Hemolisada	0.00%	0.00%

4.2.2 Efeito residual

Não foram observados nas injeções de amostra branco subsequente a injeção de uma amostra de LSQ, picos interferentes (Figura 12). Portanto não foi observado o efeito residual. O efeito residual acontece quando picos cromatográficos são observados em cromatograma de amostra branco após a injeção de amostra LSQ.

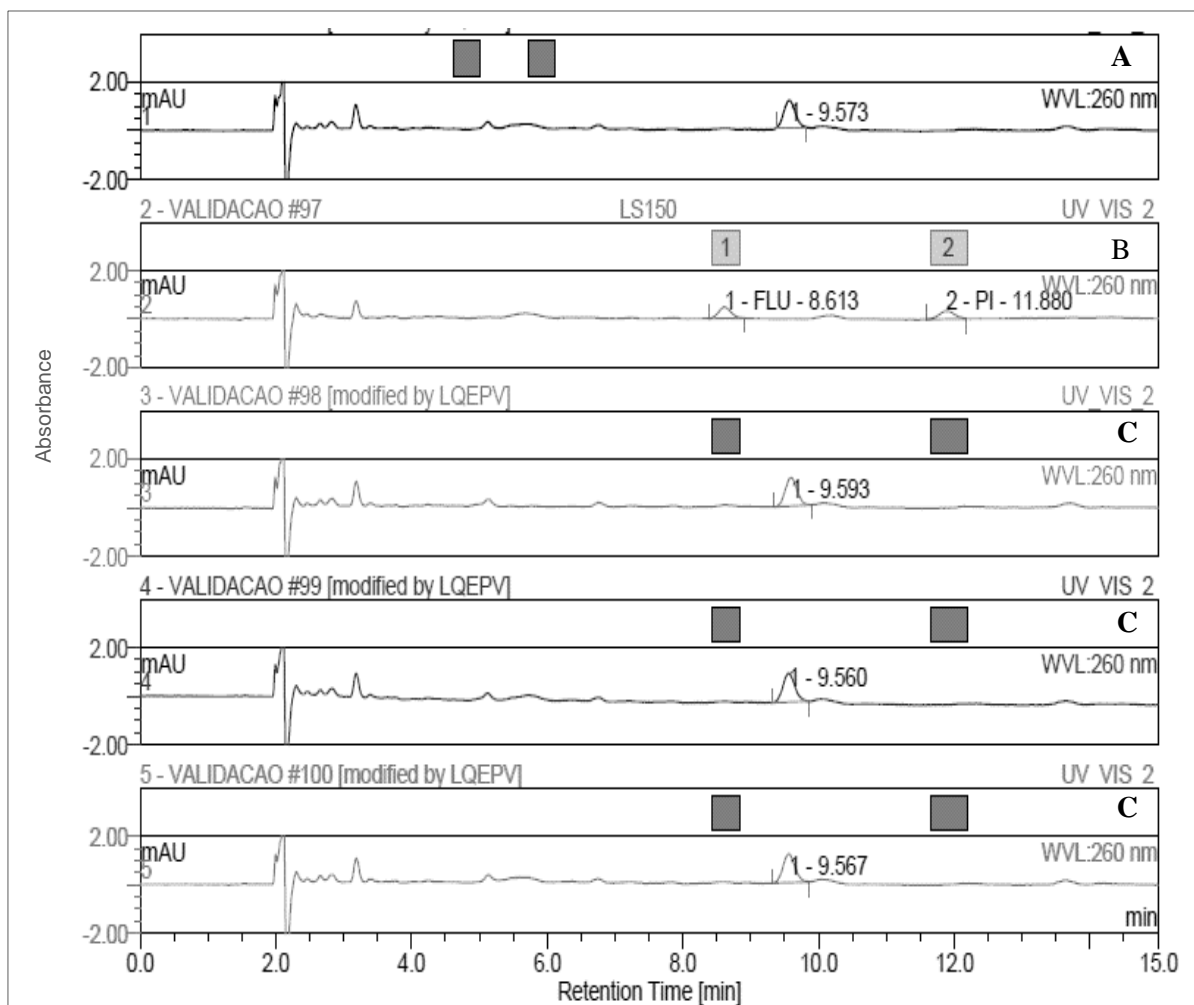


Figura 12 – Cromatogramas de amostra branco anterior a injeção da amostra de LSQ (A), amostra de LSQ (B) e três injeções subsequentes da amostra branco (C).

4.2.3 Efeito matriz

Efeito matriz é resultado da coeluição de interferentes da matriz. Este efeito pode ser minimizado de acordo com o método de extração escolhido e a partir do ajuste das condições cromatográficas.

Os coeficientes de variação dos FMNs relativos a todas as amostras (tanto CQB quanto CQA) foram abaixo de 15% conforme preconizado pela legislação (Tabela 9) demonstrando ausência de Efeito Matriz.

Tabela 9-Coeficientes de Variação dos FMNs relativos as amostras de CQB e CQA.

AMOSTRA	TIPO	FMN CQB	FMN CQA
1	Normal	1.45	1.09
2	Normal	1.51	1.06
3	Normal	1.37	1.27
4	Normal	1.44	1.19
5	Lipêmico	1.46	1.18
6	Lipêmico	1.37	1.37
7	Hemolisado	1.45	1.07
8	Hemolisado	1.52	1.03
Média		1.30	
CV (%)		13.3%	

FMN = Fator de matriz normalizado

CV (%) = Coeficiente de variação em porcentagem

4.2.4 Limite de quantificação e limite de detecção

O limite de quantificação e de detecção foram definidos com base na relação sinal ruído, sendo 10 ng/mL o limite de detecção e 20 ng/mL o limite de quantificação.

4.2.5 Curva de calibração

A linearidade do método foi avaliada na faixa de concentração de 20 a 150 ng/mL. Foram feitas três curvas analíticas, cada uma em um dia para avaliação da linearidade do método. Esta faixa de linearidade foi considerada adequada à aplicação do método na elaboração de uma curva plasmática de concentração do fármaco, pois a mesma abrangeu a maioria das concentrações obtidas nas amostras do estudo realizado.

Na tabela 10 é possível observar que a variância não se mantém constante para cada ponto da curva de calibração, ou seja a condição de homocedasticidade não é cumprida.

Tabela 10 - Avaliação da homogeneidade das variâncias dos resíduos para a curva de calibração dos três dias conforme teste F de Snecodor.

Dia	Concentração (ng/mL)	Variância (Área analito/PI)	F_{calculado}	F_{tabelado} ($\alpha=0,05$)	Condição
1	20	8.23	17.0	8.72	
	50	3.39			
	70	6.13			
	100	3.61			
	120	8.82			
	150	0.518			
2	20	2.15	73.2	4.82	Heterocedástica
	50	157			
	70	5.06			
	100	2.54			
	120	21.0			
	150	30.5			
3	20	1.30	53.2	5.05	
	50	0.774			
	70	7.09			
	100	2.68			
	120	41.2			
	150	0.873			

Portanto foi necessária a utilização do modelo de regressão linear ponderada (RLP) para harmonização das discrepâncias entre as variâncias dos diferentes pontos que constituem a curva de calibração.

O fator de ponderação foi escolhido com base no somatório do EPR e no valor de p. O fator de ponderação $1/\sqrt{x}$ apresentou o valor mais baixo do somatório de erros (\sum EPR%) ao longo das concentrações e valor de $p > \alpha$ ($\alpha=0,05$).

Os parâmetros da regressão linear ponderada (a e b) foram obtidos pelo programa Minitab. O cálculo do \sum EPR% foi realizado pelo software Microsoft Excel® a partir desses parâmetros obtidos.

Tabela 11 – Valores de concentração experimental e desvio de cada ponto da curva de calibração após a ponderação dos dados.

Concentração Nominal	\bar{X} Concentração experimental			Desvio (%)		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
20	23.8	16.6	19.2	5.23	13.3	6.74
50	57.2	48.2	54.8	4.59	3.75	3.68
70	68.2	60.4	60.7	7.40	6.73	7.96
100	98.2	101	95.4	3.97	1.83	3.43
120	115	126	125	3.47	4.21	5.49
150	130	150	181	1.00	3.98	1.30

Pode-se observar que nenhum ponto apresentou valor fora dos desvios preconizados pela legislação, ou seja se mantiveram na faixa de $\pm 20\%$ para LIQ e de $\pm 15\%$ para os demais pontos.

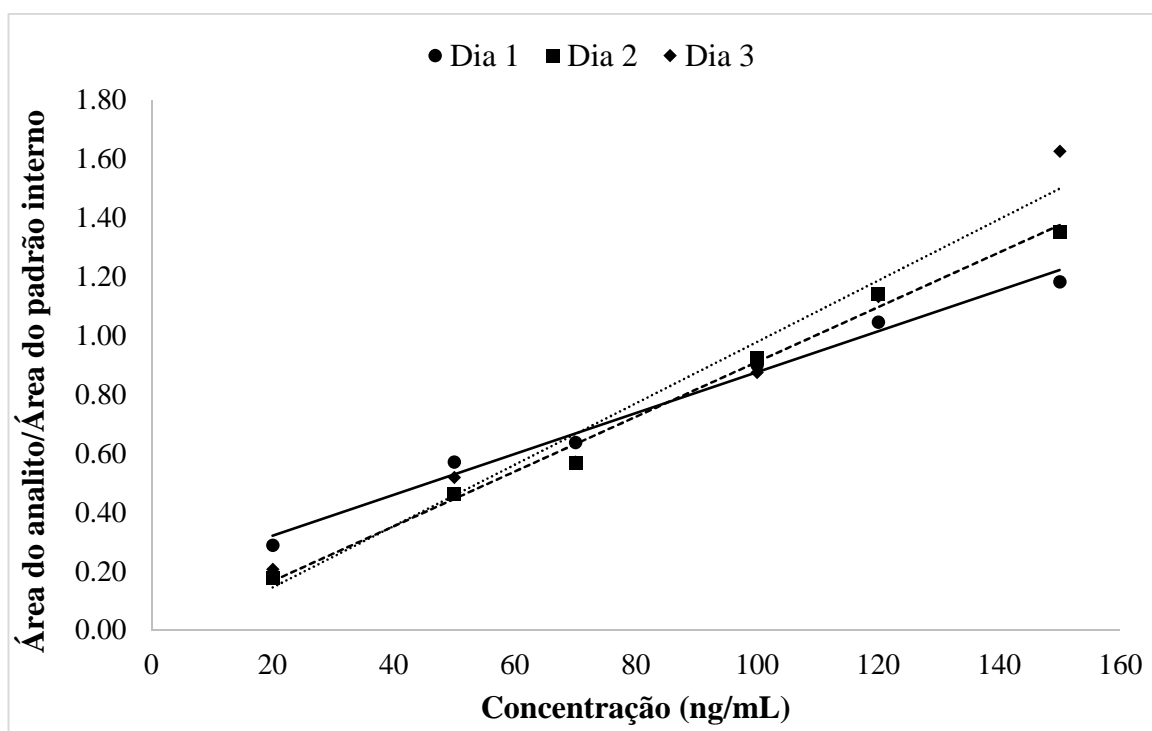


Figura 13 – Curvas de calibração analítica obtidas nos três dias de análise.

Os resultados obtidos para a curva de calibração (tabela 12) estão de acordo com o preconizado pela legislação a qual recomenda um valor de $r \geq 0,98$ (ANVISA, 2003). Com base

nesses valores é possível correlacionar a resposta obtida com a concentração do analito (tabela 11).

Tabela 12 – Equações de regressão linear ponderada das curvas de calibração do fluazuron.

Curva (dia)	Equação da reta	r ²
1	$y = 0.00693x + 0.183$	0.994
2	$y = 0.00929x - 0.0183$	1.00
3	$y = 0.0104x - 0.0626$	0.982

4.2.6 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão do método bioanalítico foram avaliadas pela análise de amostras de plasma contendo os fármacos nas concentrações do limite inferior de quantificação (LIQ) e dos controles de qualidade baixo, médio e alto (CQB, CQM e CQA, respectivamente). Para a precisão, avaliou-se o coeficiente de variação (CV) para as determinações intra-dia e inter-dias nos três dias de análise. Os valores de CV devem ser menores que 20% para o LIQ e menores que 15% para as demais amostras de controle de qualidade. A exatidão foi avaliada calculando-se o erro padrão relativo (EPR) intra-dia e inter-dias. O EPR é a distância, em porcentagem, entre o valor nominal e o valor encontrado nas determinações. São aceitáveis valores de EPR na faixa de $\pm 20\%$ para o LIQ e $\pm 15\%$ para as demais amostras de controle de qualidade. Os resultados obtidos para a avaliação da precisão e exatidão do método são apresentados na tabela 12. Pode-se observar que o método apresentou precisão e exatidão aceitáveis em todos os níveis de concentração avaliados.

Tabela 13 – Resultados de precisão e exatidão intra-dia e inter -dias em três dias de análise.

	LIQ			CQB			CQM			CQA		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Intra-corrída												
Média (ng/mL)	23.8	16.6	19.2	57.2	48.2	60.7	68.2	60.4	60.7	115	126	125
Precisão (CV %)	4.39	17.0	12.4	4.01	9.17	9.17	7.59	7.79	9.17	5.41	7.62	10.8
Exatidão (EPR %)	19.0	17.2	4.02	14.3	3.65	13.2	2.51	13.7	13.2	4.27	4.82	4.02
Inter-corrída												
Média (ng/mL)	19.8			53.4			65.4			120		
Precisão (CV %)	18.4			9.11			9.48			8.48		
Exatidão (EPR %)	-0.948			6.76			-6.64			0.115		

4.3 Aplicabilidade do Método

Após desenvolvido, otimizado e validado, o método analítico proposto foi aplicado em amostras de plasma de bovinos, procedentes de animais submetidos ao tratamento com fluazuron *pouzon*. Segundo dados de um estudo realizado com administração de fluazuron por via tópica pela WHO, o fármaco passa a ser detectado no plasma após 16 hs da administração. A escolha do primeiro tempo de coleta foi baseada nesse dado, sendo possível identificar a presença do analito 24 hs após a aplicação do fármaco (Figura 14). Considerando os valores de área obtidos e aplicando a equação da reta, referente à curva de calibração do fluazuron, o analito pode ser quantificado do dia 1 até o dia 14, apresentando um $C_{max}=62,8$ ng/mL no 2º dia ($t_{max}=48$ hs) após a administração do fármaco, se assemelhando ao C_{max} e t_{max} encontrado no estudo realizado por Luxinlun,2011(0.066 ± 0.005 mg/L e 46.168 ± 3.979 h). Nos dias 21 e 35 as concentrações detectadas foram inferiores ao limite de quantificação do método, não podendo ser quantificado com precisão e exatidão, o analito foi apenas detectado.

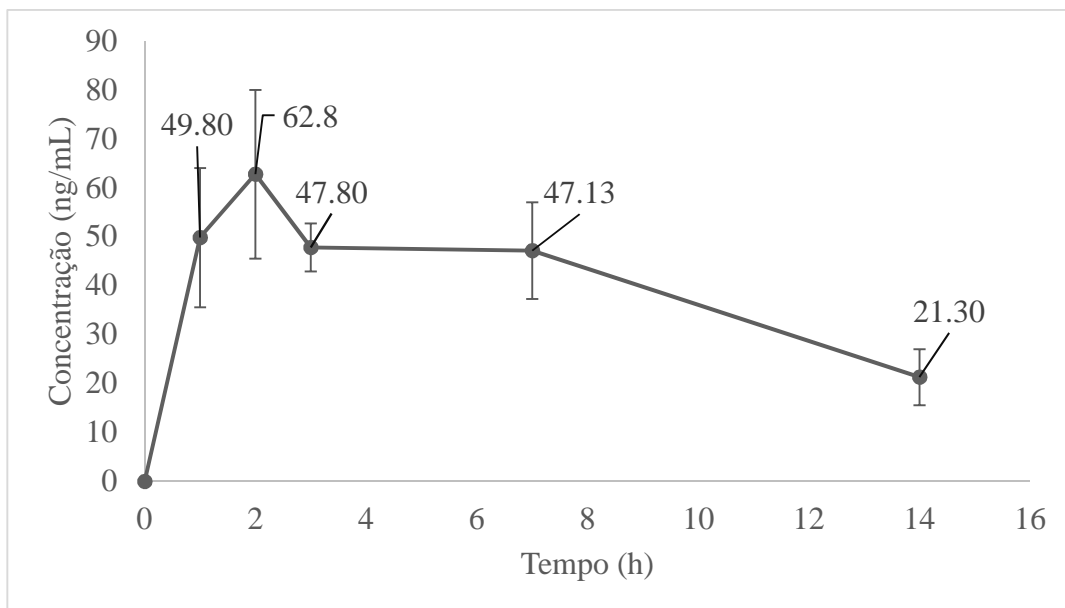


Figura 14 - Curva de concentração plasmática *versus* tempo do fluazuron após administração de formulação de fluazuron tópica em bovinos.

O método desenvolvido não possui uma faixa linear ampla para efetuar o monitoramento do fluazuron por um maior tempo no plasma, o LIQ encontrado pela metodologia é 4 (quatro) vezes menor que o LIQ descrito na literatura para quantificação do fluazuron em plasma (LUXINLUN, 2011). Entretanto para outras matrizes, o valor de LIQ encontrado pela metodologia desenvolvida está acima do descrito por Zhang et al., 2013, onde a detecção é feita por UV e valores mais baixos são descritos por Chen et al., 2014 e Yamda et al., 2006 com detecção em MS.

O comprimento de onda escolhido para quantificação do fluazuron, não corresponde ao comprimento de onda de maior absorção do composto ($\lambda=220$ nm), gerando uma absorvidade menor e conseqüentemente uma menor sensibilidade. Essa escolha foi feita baseada na quantidade de interferente que é absorvido no comprimento de onda de 220 nm, gerando cromatogramas não seletivos. Comparando o LIQ encontrado para o fluazuron no plasma com outros fármacos que são quantificados na mesma matriz, benzodiazepínicos (FERNÁNDEZ et al., 2013), ziprasidona (MERCOLINI et al., 2014), quercetina, resveratrol (KUMAR et al., 2013) e fipronil (CID et al., 2012) com detecção em UV, são encontrados valores de LIQ menores. A absorção de radiação de cada molécula está ligada a diversos fatores, mas principalmente a estrutura química da molécula.

5 CONCLUSÕES

O estudo comparativo de métodos de extração para determinação de fluazuron em plasma bovino comprovou que a técnica de EFS obteve melhores resultados quando comparada com a DMFS e ELL, demonstrando seletividade, precisão e exatidão além de possuir um menor tempo de realização e um menor custo quando comparada a DMFS. O solvente de eluição escolhido (acetato de etila) apresenta uma menor toxicidade quando comparado aos demais solventes avaliados gerando um menor impacto ambiental.

O método de extração bioanalítico desenvolvido para quantificação do fluazuron em plasma bovino por CLAE-UV apresentou todos os resultados de seletividade, efeito residual e de matriz, linearidade, precisão e exatidão satisfatórios conforme as exigências definidas na legislação de validação de métodos bioanalíticos da ANVISA.

O método se demonstrou aplicável para o fim pretendido sendo possível a determinação da curva de concentração plasmática do fluazuron após aplicação por via tópica (pour on) em bovinos. Sendo possível determinar uma faixa de concentração de 21.3 a 62.8 ng/mL no período de 1 a 14 dias após o tratamento.

Dessa maneira se conclui que a metodologia desenvolvida, otimizada e validada pode ter seu uso efetivo no monitoramento das concentrações plasmáticas de fluazuron.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a aplicação do método, é possível definir as perspectivas futuras para otimização do mesmo. O principal parâmetro a ser otimizado se refere a sensibilidade. Para tal três condições podem ser trabalhadas. A etapa de pré-concentração da amostra, pode ser melhorada, obtendo concentrações maiores para quantificação no UV. O emprego da técnica de derivatização, levando a um aumento na absorvidade molar ou a formação de um composto fluorescente, podendo ser utilizado o detector de fluorescência. O acoplamento do cromatógrafo ao espectrofotômetro de massas, pois apesar da espectrofotometria de UV/VIS ser amplamente utilizada para monitoramento de fármacos em matrizes biológicas devido a sua robustez, baixo custo e simplicidade, não é um detector ideal para determinação de fármacos em baixas concentrações.

Um aumento da sensibilidade do método permite um aumento da faixa linear, com diminuição do LIQ e conseqüentemente um aumento do tempo de monitoramento do fármaco no plasma.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADI-JOUIBARI, T. et al. Dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography–ultraviolet detection to determination of opium alkaloids in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 85, p. 14–20, 2013.

ANVISA. **Manual de boas práticas em biodisponibilidade e bioequivalencia**. 1. ed. Brasília: ANVISA, 2002.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE n 899, 29 de maio de 2003**, p. 1–15, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012**, p. 1–12, 2012.

ARMISHAW, P.; WARD, J.; MILLAR, R. G. Development of a reference material for residues of chlorfluazuron and fluazuron in beef fat ACSL CRM 3. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 356, n. 1, p. 13–16, 1996.

AZODI-DEILAMI, S. et al. Magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles for the solid-phase extraction of paracetamol from plasma samples, followed its determination by HPLC. **Microchimica Acta**, v. 181, n. 15-16, p. 1823–1832, 2014.

BACK, H. et al. A novel HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of astemizole and its major metabolite in dog or monkey plasma and application to pharmacokinetics. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 114, p. 121–6, 2015.

BALBÃO, M. S. et al. Rifampicin determination in plasma by stir bar-sorptive extraction and liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 5, p. 1078–1083, 2010.

BALDELLI, S. et al. Comparison of the QMS® analyzer with HPLC-UV for the quantification of lamotrigine concentrations in human plasma samples. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 37, n. 5, p. 1, 2015.

BARKER, S. A. Matrix solid phase dispersion (MSPD). **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 2, p. 151–162, 2007.

BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C. DE; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2015.

BUENO, M. M. **Implantação , evolução , aspectos técnicos e perspectivas da regulamentação técnica de biodisponibilidade relativa e bioequivalência de medicamentos genéricos e similares no Brasil**. [s.l.] Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2005.

BUSZEWSKI, B.; SZULTKA, M. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 198–213, 2012.

BYLDA, C. et al. Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS. **The Analyst**, v. 139, p. 2265–76, 2014.

CALDAS, S. S. et al. Modern techniques of sample preparation for pesticide residues determination in water by liquid chromatography with detection by diode array and mass spectrometry. **Quimica Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604–1617, 2011.

CAMPOS, C. D. M. et al. Preparo de amostras assistido por campo elétrico: Fundamentos, Avanços, Aplicação e Tendências. **Quimica Nova**, v. 38, n. 8, p. 1093–1106, 2015.

CAPRIOTTI, A. et al. Recent Developments in matrix solid phase dispersion extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2521–2532, 2010.

CAPRIOTTI, A. L. et al. Recent trends in matrix solid-phase dispersion. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 53–66, 2013.

CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Quimica Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021–1030, 2009.

CHAVES, A. R. et al. The development of a new disposable pipette extraction phase based on polyaniline composites for the determination of levels of antidepressants in plasma samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1399, p. 1–7, 2015.

CHEN, L. et al. Study on the simultaneous determination of seven benzoylurea pesticides in Oolong tea and their leaching characteristics during infusing process by HPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 143, p. 405–410, 2014.

CID, Y. P. et al. Determination of fipronil in bovine plasma by solid-phase extraction and liquid

chromatography with ultraviolet detection. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2063–2066, 2012.

DE OLIVEIRA, A. R. M. et al. Microextração em fase líquida (LPME): Fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 637–644, 2008.

DE OLIVEIRA, P. R. et al. Potential of the insect growth regulator, fluazuron, in the control of *Rhipicephalus sanguineus* nymphs (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): Determination of the LD 95 and LD 50. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 1, p. 35–39, 2012.

EMEA - EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **EMEA/CVMP/77290/05 Committee for Medicinal Products for Veterinary Use: Fluazuron**. Londres: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.emea.europa.eu/>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

FAEZEH, KHALILIAN AND MOHAMMAD, R. Extraction and determination of Organosulfur Compounds in water samples by using homogeneous liquid-liquid microextraction via flotation assistance-gas chromatography-flame ionization detection. **Bull.Chem.Soc.Ethiop**, v. 28, n. 2, p. 195–204, 2014.

FARHADI, K.; FIRUZI, M.; HATAMI, M. Stir bar sorptive extraction of propranolol from plasma samples using a steel pin coated with a polyaniline and multiwall carbon nanotube composite. **Microchimica Acta**, v. 182, n. 1-2, p. 323–330, 2015.

FERNÁNDEZ, P. et al. A rapid ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction followed by ultra-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of seven benzodiazepines in human plasma samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 767, p. 88–96, 2013.

FSCJ - FOOD SAFETY COMISION OF JAPAN. **Risk assessment report Fluazuron – veterinary medicinal products FS/732/2015 Food Safety Commission of Japan Report**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.fsc.go.jp/english/evaluationreports/vetmedicine/fluazuron_fs732_2015.pdf>.

HUI-YING, D. et al. Determination of 11 Benzoylurea Insecticides Residues in Vegetable by LC-MS/MS. **Journal of Instrumental Analysis**, n. 08, 2009.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida : Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13–25, 2010.

KOLLIPARA, S. et al. International guidelines for bioanalytical method validation: A

comparison and discussion on current scenario. **Chromatographia**, v. 73, n. 3-4, p. 201–217, 2011.

KUMAR, A. et al. Development and validation of an RP-HPLC method for the quantitation of odanacatib in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 27, n. 12, p. 1590–1594, 2013.

KUMAR, S.; LATHER, V.; PANDITA, D. Stability indicating simplified HPLC method for simultaneous analysis of resveratrol and quercetin in nanoparticles and human plasma. **Food Chemistry**, v. 197, p. 959–964, 2016.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. 1. ed. São Carlos: RiMa Editora, 2004.

LCGC. Overview of Sample Preparation. **LCGC:Liquid Chromatography, Gas Chromatography North America**, v. 33, n. Special, p. 1–7, 2015.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 5^a. ed. Campinas: Editora Átomo, 2008.

LUXINLUN. **Study on the Pharmacokinetics of Fluazuron and Its Residue Elimination in Cattle Tissues**. [s.l.] Dissertação de mestrado, University Yangzhou, 2011.

MAFFEI, D. F. Determinação de resíduos de pesticidas em plasma bovino por cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1713–1716, 2009.

MAJORS, R. E. Trends in sample preparation. **LCGC: Liquid Chromatography, Gas Chromatography**, v. 14, n. 9, p. 754–766, 1996.

MAJORS, R. E. **Sample Preparation Fundamentals for chromatography**. Wilmington: Agilent Technologies, 2014.

MARTINS, M. L. et al. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 35–51, 2012.

MERCOLINI, L. et al. A fast and feasible microextraction by packed sorbent (MEPS) procedure for HPLC analysis of the atypical antipsychotic ziprasidone in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 88, p. 467–471, 2014.

MITRA, S. **Sample Preparation Techniques In Analytical Chemistry**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2003.

NAVARRETE, A. et al. Simultaneous online SPE–HPLC–MS/MS analysis of docetaxel, temsirolimus and sirolimus in whole blood and human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 921, p. 35–42, 2013.

NCBI. **PubChem Compound Database.** Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound>>. Acesso em: 7 abr. 2016.

NOGUEIRA, M. et al. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 2, p. 125–143, 2015.

PANCHAGNULA, R.; THOMAS, N. S. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. **International journal of pharmaceutics**, v. 201, n. 2, p. 131–50, 2000.

PARKER, S. L. et al. A validated method for the quantification of fosfomycin on dried plasma spots by HPLC-MS/MS: Application to a pilot pharmacokinetic study in humans. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 115, p. 509–514, 2015.

PEDROSO, R. C. R. **Desenvolvimento de métodos de análise por CLAE-UV sulfametoxazol e trimetoprima utilizando sistemas de pré-concentração.** [s.l.] Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

PRETO, R. Extração em ponteiras descartáveis : fundamentos teóricos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 2, p. 101–108, 2015.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quimica Nova**, v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001.

RODRIGUES, M. et al. First liquid chromatographic method for the simultaneous determination of amiodarone and desethylamiodarone in human plasma using microextraction by packed sorbent (MEPS) as sample preparation procedure. **Journal of Chromatography B**, v. 913-914, p. 90–97, 2013.

SAID, R. et al. Determination of remifentanil in human plasma by liquid chromatography – tandem mass spectrometry utilizing micro extraction in packed syringe (MEPS) as sample preparation. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 11-12, p. 815–818, 2011.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography.** Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2009.

STORPIRTIS, S. et al. **Biofarmacotécnica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2009.

SVANSTRÖM, C. et al. Development and validation of a method using supported liquid extraction for the simultaneous determination of midazolam and 1'-hydroxy-midazolam in human plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection. **Journal**

of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 58, p. 71–77, 2012.

TANKIEWICZ, M.; FENIK, J.; BIZIUK, M. Solventless and solvent-minimized sample preparation techniques for determining currently used pesticides in water samples: A review. **Talanta**, v. 86, n. 1, p. 8–22, 2011.

YAMADA, R. et al. Simultaneous determination of residual veterinary drugs in bovine, porcine, and chicken muscle using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 54–65, 2006.

ZHANG, Y. et al. Development of a high-performance liquid chromatography method for quantification of fluazuron in cattle tissues. n. October 2014, p. 2559–2567, 2013.