

Victor Rodrigues Alves

**ESTRATÉGIAS PARA AMPLIAÇÃO DO USO DO
AUTOAMOSTRADOR COMBINADAS A INJEÇÕES
MÚLTIPLAS NA DETERMINAÇÃO DE METFORMINA EM
AMOSTRAS DE PLASMA DE TILÁPIA-DO-NILO POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE INTERAÇÃO HIDROFÍLICA
ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de Mestre em química na área de concentração de Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo A. Micke

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Alves, Victor Rodrigues
ESTRATÉGIAS PARA AMPLIAÇÃO DO USO DO
AUTOAMOSTRADOR COMBINADAS A INJEÇÕES MÚLTIPLAS NA
DETERMINAÇÃO DE METFORMINA EM AMOSTRAS DE PLASMA DE
TILÁPIA-DO-NILO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE
INTERAÇÃO HIDROFÍLICA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA
DE MASSAS / Victor Rodrigues Alves ; orientador,
Gustavo Amadeu Micke - SC, 2017.
103 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e
Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Química. 2. Outer plug internal standard
(OPIS). 3. injeções múltiplas (MISER). 4.
cromatografia líquida de interação hidrofílica
(HILIC). 5. ciclofrutano-6. I. Amadeu Micke,
Gustavo. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química.
III. Título.

Victor Rodrigues Alves

**ESTRATÉGIAS PARA AMPLIAÇÃO DO USO DO
AUTOAMOSTRADOR COMBINADAS A INJEÇÕES
MÚLTIPLAS NA DETERMINAÇÃO DE METFORMINA EM
AMOSTRAS DE PLASMA DE TILÁPIA-DO-NILO POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE INTERAÇÃO HIDROFÍLICA
ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Química com ênfase em Química Analítica e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 03 de março de 2017.

Prof. Vanderlei Gageiro Machado, Dr.
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
Universidade Federal de Santa Catarina (DQ – Florianópolis)

Banca Examinadora:

Prof. Gustavo Amadeu Micke, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina (DQ - Florianópolis)

Prof. Daniel Alfonso Spudeit, Dr.
Instituto Federal de Santa Catarina (Jaraguá do Sul)

Prof. Luciano Vitali, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina (DQ - Florianópolis)

Heitor Daguer, Dr.
Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA)

À minha mãe, em admiração a sua
renúncia, determinação e força.

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Eletroforese Capilar (LabEC) da Universidade Federal de Santa Catarina, campus Florianópolis (SC).

AGRADECIMENTOS

A Edilma, minha mãe, pelo incentivo, amor, e torcida incondicional. Por dedicar-se, insistir e cobrar. Por ressaltar que estará sempre ao meu lado. Por fazer a minha jornada mais leve. Obrigado por tudo!

A Samantha, pela alegria, companhia, cuidado e carinho dedicado a mim. Por me dar o prazer de trabalhar ao seu lado e compartilhar de todos os meus dilemas com muita paciência, além de, apontar, auxiliar, abrir meus olhos com sua sabedoria, sensatez e clareza. Obrigado também a sua família pelo suporte, motivação e bons momentos.

Ao prof. Dr. Gustavo A. Micke por proporcionar o contato com um novo e vasto mundo de conhecimento ao me orientar. Obrigado pelo aprendizado e confiança ao disponibilizar toda a infraestrutura conquistada com o seu trabalho e o trabalho de todos seus orientandos/orientados. Assim como, agradeço ao prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera por ceder o LC-MS para a realização do trabalho.

A cada um dos membros do LabEC que compartilharam deste período comigo, em especial, ao Alex, Diogo, Daniel, Jacqueline, Maressa e Prof. Dr. Luciano Vitali. Pessoas com quem pude aprender, admirar e inspirar-me. Amigos que dividiram seus conhecimentos e muito generosamente estenderam suas mãos para me ajudar em vários momentos.

Aos meus amigos, Luiz e Patrícia que participaram de momentos de muita felicidade, que se preocuparam e estiveram sempre presentes para me fazer rir e esquecer os problemas.

A UFSC por providenciar as condições e a organização. E aos profissionais Jadir Carminatti e Graça Höeller da coordenação da pós-graduação em química pelo seu trabalho muito e suporte.

Ao CNPq, INCT-Catálise pelo apoio e suporte financeiro.

RESUMO

A presente pesquisa propôs-se a explorar funcionalidades do autoamostrador, integrando estratégias para preparação de curvas de calibração em sua seringa com um método combinado ao emprego da padronização interna por injeção do próprio analito, *outer plug internal standard* (OPIS), segregando-o da amostra por injeções múltiplas, *multiple injection in a single experimental run* (MISER). Com este último alcançou-se maior confiabilidade na análise quantitativa, ao ampliar a repetitividade entre dias em análises ESI-MS/MS no modo positivo, na determinação de metformina em 16 amostras de plasma de tilápias-donilo. Com o volume de injeção de 2,0 μL foram preparadas soluções de diferentes níveis de concentração a partir de solvente puro, solução padrão de metformina e extrato das amostras, obtidos após precipitação protéica com acetonitrila (0,1% ácido fórmico, v/v) para que, por fim, fosse possível reproduzir a calibração por fortificação de extrato de matriz isenta. Este procedimento foi realizado sem a interferência do operador, com pouco volume de amostra, de maneira a minimizar o uso da matriz, com ciclos de injeção de aproximadamente 25 s cada. Para a separação optou-se pela modalidade de cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC), a qual pode ser cumprida utilizando uma coluna cromatográfica (4,6 mm x 150 mm; 5 μm ; 40°C) de fase estacionária composta por ciclofrutano-6 nativo, quimicamente ligado à sílica (FRULIC-N). A eluição do analito foi conduzida a 0,5 mL min^{-1} com fase móvel gradiente composta por acetonitrila/água (70:30,, v/v), ambos contendo 10 mmol L^{-1} de formiato de amônio, e pH da solução aquosa mantido em 3,2. O método foi validado e, apresentou boa compatibilidade com o modelo linear ($R^2 = 0,999$) na faixa de concentração avaliada (20 – 140 ng mL^{-1}). O limite de detecção foi de 0,8 ng mL^{-1} e o limite de quantificação 2,1 ng mL^{-1} . As precisões instrumental, intra-ensaio e inter-ensaio, expressas pelo coeficiente de variação para a área do pico, apresentaram valores melhores que 3,28%. Do ensaio de recuperação foram obtidas concordâncias de 94,2% - 99,8%. E o método proposto propiciou o dispêndio de 3,7 vezes menos tempo e solventes quando comparado ao método de injeção convencional para um mesmo número de amostras.

Palavras-chave: *Outer plug internal standard* (OPIS). Injeções múltiplas (MISER). Cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC). Ciclofrutano-6.

ABSTRACT

The aim of the present study was to explore the functions of autosampler, integrating strategies for the preparation of calibration curves in the autosampler's syringe with a method that uses the analyte itself as internal standard, called outer plug internal standard (OPIS), segregating it from the sample by multiple injections in a single experimental run (MISER). With this procedure greater reliability was achieved in a quantitative analysis, by increasing the repeatability between days in positive-mode ESI-MS/MS analyzes applied in the determination of metformin in 16 plasma samples from Nile tilapia. At the injection volume of 2.0 μL , solutions of different concentration levels were prepared from mixing pure solvent, standard solution of metformin and extract of the samples, obtained after protein precipitation with acetonitrile (0.1% formic acid, v/v), than finally, it was possible to reproduce the calibration by addition in the free matrix extract. This procedure was performed without interference from the operator, with a small sample volume, in order to minimize the use of the matrix, with injection cycles of approximately 25 s each. For the separation, the hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) method was chosen, which can be accomplished using a stationary phase chromatographic column (4.6 mm x 150 mm, 5 μm ; 40 ° C) composed of native cyclofructan-6, chemically bounded to silica (FRULIC-N). Analyte elution was conducted at 0.5 mL min⁻¹ with a gradient phase mobile composed of acetonitrile/water (70:30, v/v), both containing 10 mmol L⁻¹ of ammonium formate, and pH of aqueous solution fixed at 3.2. The method was validated and presented good compatibility with the linear model ($R^2 = 0.999$) in the evaluated concentration range (20 - 140 ng mL⁻¹). The limit of detection and quantitation was 0.8 ng mL⁻¹ and 2.1 ng mL⁻¹, respectively. The instrumental, intra-assay and inter-assay precision, expressed by the relative standard deviation for the peak area, presented values better than 3.28%. From the recovery assay concordances of 94.2% - 99.8% were obtained. And the proposed method allowed the waste of 3.7 times less analysis time and solvents when compared to the conventional injection method for the same number of samples.

Keywords: *Outer plug internal standard (OPIS). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC). Multiple injection in a single experimental run (MISER). Ciclocfrutan-6.*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura referente a 1,1-dimetilbiguanida, mais conhecida como metformina.....30
- Figura 2.** Equilíbrio de espécies e sua coexistência em função do pH e carga global associada.31
- Figura 3.** Representação de um exemplar de Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).33
- Figura 4.** Esquema ilustrando as principais partes necessárias para a realização de análises por HPLC.36
- Figura 5.** Processo de formação do eletrospray e geração de íons em fase gasosa até o seu direcionamento para o espectrometro de massas.38
- Figura 6.** Esquema do analisador de massas triplo quadrupolo. Representação de cada um dos quadrupolos (Q1, Q2 e Q3) e suas funções.39
- Figura 7.** Características de outros modos cromatográficos comuns a HILIC. 41
- Figura 8.** Ilustração da dinâmica proposta para o mecanismo mais aceito que rege separações HILIC.42
- Figura 9.** Número de publicações com as palavras-chave “hydrophilic interaction chromatography” no período de 1990-2015.43
- Figura 10.** (a) Representação molecular e a (b) estrutura cristalina resolvida do CF6, no modelo de bastonetes (carbonos em cinza e oxigênios em vermelho). 46
- Figura 11.** Ilustração comparativa de três métodos de injeção diferentes. Uma maneira esquemática de apontar o aumento significativo da frequência analítica.48
- Figura 12.** APEA requer a aspiração de alíquotas das soluções x, y e z (A, B e C), a seringa mistura do conteúdo aspirado (D), posteriormente é lavada a parte externa em fase móvel (E) e, por fim, o conteúdo é injetado (F).50
- Figura 13.** Esquema representativo que explicita a comparação de duas maneiras de inserção do padrão interno exemplificados em cromatogramas distintos. Em (a) a injeção de uma solução contendo o analito A e o isótopo do analito A (linha tracejada), ambos possuem t_R igual e podem ser discernidos pela

m/z diferente e, em (b) usa-se a padronização interna OPIS, o próprio analito é empregado como padrão interno é introduzido por outra injeção, que não a da amostra, em momentos diferentes.52

Figura 14. Ilustração referente ao procedimento adotado para o preparo das amostras de tilápia-do-nylo, de maneira manual, e automatizada (figura mais abaixo).63

Figura 15. Espectro (MS2) obtido da infusão de uma solução de metformina. 69

Figura 16. Variação da composição da fase móvel, entre 10 e 90% (v/v), em termos da porcentagem de acetonitrila na retenção (k) da metformina. (Condições do experimento coluna FRULIC-N (4,6 x 150 mm; 5 μ m), 25°C; solvente complementar: solução de formiato de amônio 25 mmol L⁻¹; inj. 5 μ L de solução padrão de metformina de 50 ng ml⁻¹; marcador de t₀ = tercbutilmetil éter, valor 3,0 minutos).72

Figura 17. Variação de k observadas para valores de pH entre 3 e 6 empregados na fase móvel aquosa.75

Figura 18. Modificações na temperatura do compartimento de acomodação termostatizado e o efeito provocado no t_r para a metformina. (Condições do experimento coluna FRULIC-N (4,6 x 150 mm; 5 μ m), 0,5 ml min⁻¹ (70:30) ACN:H₂O (solução aquosa pH 3,2), ambos 10 mmol L⁻¹ formiato de amônio ; inj. 5 μ L de solução padrão de metformina de 50 ng ml⁻¹; marcador de t₀ = tercbutilmetil éter, valor médio de 3,1).76

Figura 19. Valores de N m⁻¹ em função da variação no vol. de injeção. (Condições do experimento coluna FRULIC-N (4,6 x 150 mm; 5 μ m, 40°C), 0,5 ml min⁻¹ (70:30) ACN:H₂O (solução aquosa pH 3,2), ambos 10 mmol L⁻¹ formiato de amônio ; inj. 5 μ L de solução padrão de metformina de 50 ng ml⁻¹; marcador de t₀ = tercbutilmetil éter, valor médio de 3,1).77

Figura 20. Cromatograma (LC-MS/MS) obtido pela injeção de 2 μ L da amostra M8 contendo metformina, eluida a 0,5 mL min.⁻¹ em uma fase móvel de ACN:H₂O (10 mmol L⁻¹ - pH 3,2) na proporção de 70:30 em modo isocrático na FRULIC-N (40°C).78

Figura 21. Curva de calibração por fortificação do extrato da matriz isenta (20 – 140 ng mL⁻¹) com picos intercalados do analito desempenhando a função de

padrão interno (80 ng mL⁻¹) preparados na seringa do autoamostrador por programação via software (LC-MS/MS). (Condições do experimento coluna FRULIC-N (4,6 x 150 mm; 5 µm, 40°C), 0,5 ml min⁻¹ (70:30) ACN:H₂O (solução aquosa pH 3,2), ambos 10 mmol L⁻¹ formiato de amônio; inj. 2 µL. ..79

Figura 22. Curva de calibração (20 – 140 ng mL⁻¹) por fortificação do extrato da matriz isenta, preparada de maneira automatizada na seringa do autoamostrador (LC-MS/MS), empregando padronização interna com o analito em um nível de concentração de 80 ng mL⁻¹ (PI). (Condições do experimento coluna FRULIC-N (4,6 x 150 mm; 5 µm, 40°C), 0,5 ml min⁻¹ (70:30) ACN:H₂O (solução aquosa pH 3,2), ambos 10 mmol L⁻¹ formiato de amônio; inj. 2 µL.) .81

Figura 23. Resíduos da regressão observados para a calibração utilizada no presente trabalho.86

Figura 24. Comparação das curvas de calibração por superposição de matriz realizada de maneira manual (quadrado) e automatizada (losango) (n = 10)....87

Figura 25. Rack do autoamostrador contendo recipientes referentes (a) curvas de calibração por fortificação do extrato de matriz isenta do compartimento e (b) recipientes contendo o extrato matricial, solução padrão e solvente. Com três recipientes (b) é possível realizar inúmeras réplicas autênticas de curvas de calibração com diversos níveis de concentração com pequenas alíquotas misturadas na seringa do autoamostrador, por comandos básicos do software..91

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Alguns exemplos de métodos e condições empregadas para análise de metformina por HILIC.....**45**
- Tabela 2.** Valores variados para a otimização de cada um dos fatores da fonte de ionização e do analisador de massas.**61**
- Tabela 3.** Linhas de comando, valores e posições, para programação de apenas um ciclo de injeção do autoamostrador. Respectivamente o emprego de MISER (a), APEA (b) e OPIS (c). (PX_n-Y_n-Z_n indica localizações genéricas de recipientes (*vials*)).**65**
- Tabela 4.** Energias (DP, EP, CE, CEP e CXP) otimizadas para o processo de ionização das transições monitoradas para respostas relativas à metformina. ...**70**
- Tabela 5.** Valores ótimos para os parâmetros da fonte de ionização independentes do composto.**71**
- Tabela 6.** Valores observados para a simetria e fator de retenção ao variar a concentração (mmol L⁻¹) de formiato de amônio na composição da fase móvel. (Condições do experimento coluna FRULIC-N (4,6 x 150 mm; 5 µm), 25°C; ACN:H₂O (70:30); inj. 5 µL de solução padrão de metformina de 50 ng ml⁻¹; marcador de t₀ = tercbutilmetil éter, valor médio de 3,1).**74**
- Tabela 7.** Avaliação do efeito do uso da padronização interna utilizando o próprio analito (OPIS) entre diferentes dias por comparação dos CVs e tratamento estatístico por ANOVA fator único (α = 95%).**82**
- Tabela 8.** Medição do erro provocado pela variação no volume de injeções de tolueno realizadas pelo autoamostrador utilizado em todo o trabalho (Condições do método: HPLC-UV com detecção em 255 nm; coluna Agilent Zorbax Eclipse Plus C-18 (4,6 x 150 mm; 5 µm); MeOH (95%):H₂O como eluente a 1 mL min⁻¹ em modo isocrático na proporção 85:15, número de réplicas = 25). ..**84**
- Tabela 9.** Parâmetros de validação relativos a seletividade e linearidade da calibração automática por superposição de matriz, com padronização interna. **85**
- Tabela 10.** Valores dos parâmetros de mérito observados para a metformina, em termos das precisões avaliadas com relação ao coeficiente de variação (%).**88**

Tabela 11. Valores observados a partir do ensaio de recuperação para a adição de metformina ao plasma de tilápia-do-nylo.89

Tabela 12. Valor encontrados para metformina em 10^3 ng mL⁻¹ nas amostras de plasma de tilápia-do-nylo.90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	acetonitrila;
AMP	Adenosina monofosfato;
AMPK	proteína quinase ativada por AMP;
APCI	ionização química a pressão atmosférica, do inglês <i>atomic pressure chemical ionization</i> ;
APEA	adição automatizada pós-extração, do inglês <i>automated postextraction addition</i> ;
API	ionização a pressão ambiente, do inglês <i>atmospheric pressure ionization</i> ;
APPI	fotoionização a pressão atmosférica, do inglês <i>atomic pressure photoionization</i> ;
BP	farmacopéia britânica, do inglês <i>British Pharmacopoeia</i> ;
CE	energia de colisão, do inglês <i>collision energy</i> ;
CE-MS	Eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas, do inglês <i>capillary electrophoresis tandem mass spectrometry</i> ;
CF-6	ciclofrutano-6;
CV	Coeficiente de variação;
CXP	potencial de saída da célula, do inglês <i>Cell exit potential</i> ;
CZE-UV	eletroforese capilar de zona com detector ultravioleta, do inglês <i>capillary zone electrophoresis with ultraviolet detection</i> ;
DAD	detector de arranjo de diodos, do inglês, <i>diode array detector</i> ;
DP	potencial de dessolvatação, do inglês <i>Declustering potential</i> ;
EP	potencial de entrada, do inglês <i>Entrance potential</i> ;

ESI	ionização por eletrospray, do inglês, <i>Electrospray ionization</i> ;
FIA	análise por injeção de fluxo, do inglês <i>flow injection analysis</i> ;
GC-FID	cromatografia a gás com detector por ionização em chama, do inglês, <i>gas chromatography with fire ionization detector</i> ;
GC-MS	cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas, do inglês, <i>gas chromatography tandem mass spectrometry</i> ;
HILIC	cromatografia líquida de interação hidrofílica, do inglês, <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i> ;
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, <i>high performance liquid chromatography</i> ;
k	fator de retenção;
LC	cromatografia líquida, do inglês, <i>liquid chromatography</i> ;
LC-MS/MS	cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial, do inglês, <i>liquid chromatography tandem mass spectrometry</i> ;
MAPA	Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento;
L_{det}	distância do capilar até a janela de detecção, utilizado em eletroforese capilar;
MISER	injeções múltiplas em uma única corrida experimental, do inglês <i>multiple injection in a single experimental run</i> ;
MRM	monitoramento de múltiplas reações, do inglês <i>multiple reaction monitoring</i> ;
MS	espectrometria de massas, do inglês <i>mass spectrometry</i> ;
N	refere-se a eficiência cromatográfica de uma substância (número de pratos);
NPLC	modalidade de cromatografia líquida de fase normal, do inglês

	<i>normal phase liquid chromatography</i> ;
OPIS	padronização interna empregando o próprio analito segregado da injeção contendo a amostra, do inglês <i>outter plug internal standard</i> ;
PI	padrão interno;
PPT	precipitação proteica, do inglês <i>protein precipitation</i> ;
RAMAN	espectroscopia rotovibracional;
RPLC	modalidade cromatográfica de fase reversa, do inglês <i>reversed phase liquid chromatography</i> ;
RPM	rotações por minuto;
R _s	refere-se a resolução cromatográfica;
RSD	desvio padrão relativo, do inglês <i>relative standard deviation</i> ;
SP	fase estacionária, do inglês, <i>stationary phase</i> ;
SPE	extração em fase sólida, do inglês <i>solid phase extraction</i> ;
t ₀	tempo morto
t _r	tempo de retenção
USP	farmacopéia americana, do inglês <i>United States Pharmacopoeia</i> ;
UV	refere-se à frequência de radiação na região ultravioleta do espectro luminoso;
VIS	refere-se à frequência de radiação na região visível do espectro luminoso.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
2	REVISÃO DA LITERATURA	29
2.1	METFORMINA	29
2.1.1	<i>Aspectos gerais.....</i>	29
2.1.2	<i>Aspectos físico-químicos.....</i>	31
2.1.3	<i>Carboidratos e metformina na dieta de peixes</i>	32
2.2	ANÁLISE DE METFORMINA EM FLUÍDOS BIOLÓGICOS	34
2.2.1	<i>Plasma e precipitação proteica</i>	34
2.2.2	<i>Métodos de análise de metformina em fluidos biológicos ...</i>	35
2.3	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA ANÁLISE DE COMPOSTOS POLARES	36
2.3.1	<i>Cromatografia líquida por interação hidrofílica</i>	41
2.4	CICLOFRUTANO-6 COMO FASE ESTACIONÁRIA.....	46
2.5	APLICAÇÕES DO AUTOAMOSTRADOR NO DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS.....	47
2.5.1	<i>Análise por injeção em fluxo (FIA)</i>	47
2.5.2	<i>Injeções múltiplas em um único experimento cromatográfico</i> <i>48</i>	
2.5.3	<i>Adição automatizada pós-extração.....</i>	49
2.5.4	<i>Padronização interna com o próprio analito</i>	50
2.6	VALIDAÇÃO	53
2.6.1	<i>Parâmetros de mérito.....</i>	53
2.6.2	<i>Seletividade</i>	53
2.6.3	<i>Linearidade</i>	53
2.6.4	<i>Precisão</i>	54
2.6.5	<i>Limite de detecção e quantificação</i>	54
2.6.6	<i>Exatidão.....</i>	55
3	OBJETIVOS.....	57
3.1	OBJETIVO GERAL	57
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
4	EXPERIMENTAL	59
4.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	59
4.2	INSTRUMENTAÇÃO	59
4.2.1	<i>Condições cromatográficas e espectrométricas</i>	59
4.3	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO	60

4.3.1	<i>Otimizações dos parâmetros do espectrômetro de massas</i>	60
4.3.2	<i>Otimizações dos parâmetros cromatográficos</i>	61
4.3.2.1	Porcentagem de acetonitrila	61
4.3.2.2	Natureza e concentração do aditivo	61
4.3.2.3	pH	62
4.3.2.4	Temperatura	62
4.3.2.5	Volume de injeção	62
4.4	PREPARO DAS AMOSTRAS DE PLASMA	62
4.5	MÉTODOS DE INJEÇÕES MÚLTIPLAS (MISER)	64
4.5.1	<i>Magnitude das variações de injeção causadas pelo autoamostrador</i>	65
4.6	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	66
4.6.1	<i>Parâmetros de conformidade</i>	66
4.6.2	<i>Parâmetros de mérito</i>	66
4.6.2.1	Efeito de matriz	67
4.6.2.2	Linearidade	67
4.6.2.3	Limites de detecção e quantificação	67
4.6.2.4	Precisões instrumental, intra-dia e intermediária	67
4.6.2.5	Ensaio de recuperação	68
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO	69
5.1.1	<i>Otimização dos parâmetros do espectômetro de massas</i>	69
5.1.2	<i>Otimização do método cromatográfico</i>	71
5.1.2.1	Porcentagem de solvente orgânico	72
5.1.2.2	Natureza e concentração de aditivo	73
5.1.2.3	pH	74
5.1.2.4	Temperatura	76
5.1.2.5	Volume de injeção	76
5.2	MÉTODO DE INJEÇÕES MÚLTIPLAS COM PREPARO AUTOMATIZADO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO NA SERINGA DO AUTOAMOSTRADOR E PADRONIZAÇÃO INTERNA COM O PRÓPRIO ANALÍTO	78
5.2.1	<i>Magnitude do erro proporcionado por variações no volume de injeção</i>	83
5.3	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MÉRITO	84
5.4	AMOSTRAS DE PLASMA DE TILÁPIA-DO-NILO	89
5.5	DESTAQUES DO MÉTODO PROPOSTO	90
6	CONCLUSÃO	93
	REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO

A metformina é um medicamento amplamente distribuído no tratamento de diabetes tipo II (não insulino-dependente) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Sua característica polar exige métodos cromatográficos com estratégias alternativas que proporcionem retenção adequada, para que seja possível realizar inferências em respeito a amostras de uma maneira inequívoca.

Neste contexto, a coluna de ciclofrutano-6 nativo (FRULIC-N), desenvolvida para aplicações em cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC), propõe-se a auxiliar análises diretas de íons e moléculas polares altamente funcionalizadas em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) convencional (PADIVITAGE & ARMSTRONG, 2011). Devido à sua recente concepção, ainda não foram reportados métodos que avaliem seu potencial frente a análises quantitativas.

Uma problemática que envolve a baixa assimilação de carboidratos por peixes, motivou o Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI-UFSC) a estudar a suplementação da metformina na dieta de espécies de tilápia-do-nylo, visto que, o medicamento tem como princípio a melhoria no aproveitamento da glicose disponível no sangue (CHO et al., 2015). A iniciativa dos pesquisadores visa avaliar principalmente o desempenho e a composição corporal das espécies em questão, além de verificar a variação dos níveis de metformina no plasma sanguíneo dos peixes, em comparação ao que foi administrado inicialmente.

Para determinação de medicamentos em amostras de fluidos biológicos, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) é considerada o “estado da arte” (VAN EECKHAUT et al., 2009). Nestas e em outras amostras, o efeito de matriz torna-se um assunto frequente em métodos desta plataforma, promovendo aumento ou supressão da ionização do analito na própria fonte de ionização (TAYLOR, 2005). Para avaliação deste efeito, são preparadas curvas de calibração utilizando a própria amostra, por exemplo, as curvas de calibração por superposição de matriz, e compara-se a reta obtida por regressão linear com a obtida a partir do analito em solvente puro (KRUIVE et al., 2015).

Por envolver a matriz, o procedimento de preparo destas curvas é considerado trabalhoso e pode ocasionalmente prover erros. A adição automatizada pós-extração (APEA), utiliza o autoamostrador para avaliar o efeito de matriz de modo simplificado, ao co-injetar o extrato

matricial de amostras biológicas em conjunto com a própria solução padrão do analito (ROGERS et al., 2016).

Sendo assim, o autoamostrador demonstra ser uma ferramenta que proporciona benefícios para métodos que buscam alto rendimento, sem a obrigatoriedade de um operador presente a todo tempo. Assim como a APEA, estratégias inovadoras nos métodos de injeção ilustram a simbiose dos injetores automáticos com as técnicas cromatográficas (SIEGLE & TRAPP, 2015).

Outro exemplo prático desta ferramenta, são as injeções múltiplas em um único experimento (MISER), que podem ser incorporadas de maneira simples aos métodos de separação e os benefícios de sua implementação são notáveis, ao agregar maior frequência analítica, praticidade no tratamento de dados e uma importante economia de solventes (WELCH, 2010).

Indo além, uma idealização do Laboratório de Eletroforese Capilar (LabEC) - UFSC, de onde surge o presente trabalho, sugere que com auxílio do autoamostrador verifique-se a possibilidade de promover o uso da padronização interna acessada por MISER, com injeções do próprio analito para corrigir a si mesmo. Ao selecionar o próprio composto para esta finalidade pretende-se garantir a premissa definida para a escolha de um padrão interno ideal.

A combinação destas estratégias em um mesmo método pode vir a proporcionar a análise rápida de curvas de calibração e amostras em “batelada” em apenas um experimento, aliado a praticidade no preparo das soluções realizado na seringa do autoamostrador.

Com a implementação deste método de injeção deseja-se atingir maior congruência na sensibilidade verificada entre curvas de calibração realizadas em dias diferentes, facilitar o acesso ao efeito de matriz e possivelmente suprimi-lo ou minimizá-lo, mediante uma possível capacidade de normalização do método de padronização interna com o próprio analito. Além de, avaliar seu desempenho por procedimento de validação e utilizá-lo em combinação com HILIC-MS/MS para determinação de metformina em amostras de plasma de tilápia-do-nilo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 METFORMINA

2.1.1 Aspectos gerais

A *diabetes mellitus* é uma denominação para um grupo de doenças crônicas diagnosticadas pelo alto índice glicêmico dos acometidos. De acordo com o documento de 2016, *Global Report on Diabetes* redigido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), as principais classificações desta doença são discriminadas como: tipo 1 - quando o pâncreas não é capaz de produzir insulina (hormônio que regula o açúcar no sangue); tipo 2 - quando o corpo não é capaz de fazer bom uso da insulina que produz, entre outros.

O mesmo relatório da OMS informou que o número de pessoas vivendo com diabetes quadruplicou (422 milhões), de 1980 a 2014. As informações contidas no documento atribuem o aumento de doentes aos maus hábitos alimentares da população, acompanhado por uma crescente no número de pessoas obesas e com sobrepeso. O órgão recomenda cuidado medicamentoso e alimentar para o controle glicêmico.

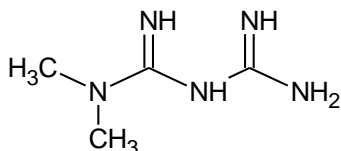
Além da utilização de medicamentos, o tratamento recomendado alia exercícios físicos a uma severa restrição de alimentos ricos em açúcares. Entretanto, baixos níveis de açúcares no sangue, essenciais a produção de energia, são o gatilho para que o próprio organismo produza glicose por um processo denominado gluconeogênese. Este ocorre principalmente no fígado, e é um dos principais mecanismos de manutenção dos níveis de glicose no sangue. Consiste na quebra proteica e lipídica para respectiva geração de glicerol e aminoácidos com posterior conversão destes em glicose. (ARGAUD et al., 1993; KIM et al., 2008).

Antigamente utilizada no tratamento de pacientes com sintomas atrelados a diabetes tipo 2, a *Galega officinalis*, em 1918, ficou conhecida como uma variedade de erva rica em compostos da família das guanidinas, distintos pela sua alta atividade hipoglicêmica. Posteriormente, os compostos presentes na erva e análogos desta família passaram a ser estudados intensivamente, até os pesquisadores constatarem alta toxicidade para maior parte das espécies. Por este motivo, o estudo destes compostos no tratamento de diabetes foi descontinuado, o que deu espaço a alternativas sintéticas como as biguanidas e o tratamento via insulina (BAILEY & DAY, 2004).

Conhecida nas Filipinas por ter sido utilizada no combate a influenza, a 1,1-dimetilbiguanida (Figura 1), foi selecionada por John Sterne (farmacêutico 1909 – 1997) como uma das candidatas a estudos clínicos como antidiabético. E em 1957, seus estudos foram publicados, atestando a superior eficácia desta substância dentre o grupo avaliado. O próprio Sterne nomeou-a como “*Glucophage*” (comedora de glicose), atualmente o nome de uma de suas variantes comerciais de mais destaque (BAILEY & DAY. 2004; CHHETRI, et al., 2014).

Desde então, a metformina, como é conhecida a 1,1-dimetilbiguanida, popularizou-se mundialmente como o mais difundido, prescrito e efetivo antidiabético oral para pacientes com diabetes não insulino-dependente. Sua ação é explorada a mais de meio século, entretanto o mecanismo de atuação permanece com poucas evidências. Uma destas, estudada por Madiraju et al. (2014), relata que, além de melhorar a utilização da glicose, a metformina age inibindo o mecanismo de geração endógena hepática de glicose (gluconeogênese) via supressão da enzima glicerofosfatase desidrogenase, reponsável por processos redox. Isto resulta em uma alteração da carga hepatocelular, que leva a diminuição da conversão de lactato e glicerol a glicose.

Figura 1. Estrutura referente a 1,1-dimetilbiguanida, mais conhecida como metformina.



Fonte: Autor.

Outra hipótese se baseia no envolvimento da metformina proporcionando alterações de funções básicas a partir da fosforilação da proteína ativada AMP quinase (AMPK) e da proteína receptora X alfa (LRX α), localizada no fígado. O primeiro atua como regulador de lipídios e glicose no metabolismo celular, enquanto que o segundo administra os reguladores macrófagos locais (CHO et al., 2015).

A relevância e os benefícios deste fármaco não se restringem apenas a contenção da diabetes tipo II. Descobertas recentes feitas com base em pacientes diabéticos obesos indicou sobrevida e diminuição do colesterol LDL e triglicérides plasmáticos (WULFFELÉ, et al., 2004), além disso, foi constatado potencial no tratamento de mulheres

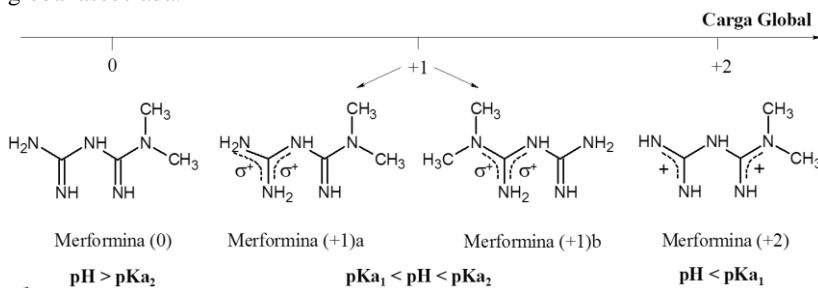
diagnosticadas com a síndrome do ovário policístico (SAINI, et al., 2016) e combate a cânceres e tumores (SOSNICKI, et al., 2016). Barzilai, et al., (2016) sugere que a maior parte das doenças combatidas pelo fármaco tem como princípio o envelhecimento celular acelerado, e este seria o alvo do tratamento/atividade da metformina no organismo.

2.1.2 Aspectos físico-químicos

Mais comumente empregada em formulações farmacêuticas, comercializadas sob prescrição médica, na forma de comprimidos de cloridrato de metformina de 500 até 1000 mg. É uma substância sólida e cristalina, de coloração branca e odor semelhante ao exalado pela decomposição da carne de peixes. Além de conferir a metformina um caráter básico, a presença de grupamentos amina lhe propicia realizar ligações de hidrogênio. Esta característica explica sua elevada polaridade, solubilidade ($1,38 \text{ g cm}^{-3}$) e hidrofiliçidade ($\log P -2,6$).

Outra informação de grande importância é a que diz respeito à natureza iônica das espécies de metformina em equilíbrio (pK_a 2,8 e 11,5). Com auxílio da espectroscopia RAMAN experimentos voltados para a compreensão do equilíbrio de protonação/desprotonação, constataram o descrito na Figura 2.

Figura 2. Equilíbrio de espécies e sua coexistência em função do pH e carga global associada.



Na faixa de pHs que compreende $7,0 \pm 4,0$ a metformina é majoritariamente monoprótica, diprótica em pHs inferiores a 1,5 e a espécie neutra não foi observada, mesmo em pHs superiores a 13,0. Cálculos teóricos baseados na teoria da densidade funcional demonstraram que há a coexistência de duas espécies monopróticas em meio aquoso (HERNÁNDEZ, et al., 2015).

2.1.3 Carboidratos e metformina na dieta de peixes

O valor nutricional dos carboidratos na dieta de algumas espécies de peixes são objetos de estudos e pesquisas, isto porque este nutriente parece não exercer papel central neste tipo de metabolismo, diferindo do que ocorre nos mamíferos (HEMRE et al., 2002).

Em uma compilação sobre o assunto, Wilson (1994) referenciou em seu trabalho que a grande maioria dos peixes possui baixa capacidade de assimilação dos carboidratos e, além disso, não o tem como nutriente essencial. Esta limitação é maior em espécies marinhas e peixes de água gelada do que em espécies de água doce. Este fato está relacionado com a dependência da complexidade do carboidrato, visto que, algumas espécies utilizam melhor os açúcares simples e outras não são capazes de utilizá-los como fonte de energia.

As constatações experimentais direcionam para uma abordagem mais cuidadosa com a dieta das variedades de peixes utilizadas em culturas voltadas para consumo. Quantidades pré-determinadas de certo tipo de carboidrato podem promover sua disponibilidade adequada na corrente sanguínea, com o intuito de seu aproveitamento e, conseqüentemente, supressão da perda proteica via gluconeogênese, o que implica em uma estratégia de manutenção da massa muscular da cultura (EL-SAYED & ABDEL-FATTAH, 2006).

Aproximadamente 50% dos gastos com a cultura de peixes são destinados a alimentação. Por ser uma fonte de massa e energia de baixo custo e grande acessibilidade, as rações possuem em sua composição cerca de 60 - 80% (m/m) de grãos, cereais, farelos de arroz, trigo e milho (BOSCOLO et al., 2002; EL-SAYED & ABDEL-FATTAH, 2006). Porém, não há limites e norma nutricional quanto à utilização de carboidratos em produtos alimentícios voltados para a piscicultura.

Diante desta relativa limitação metabólica dos peixes, a metformina pode ser implementada com o propósito de aprimorar o aproveitamento dos carboidratos excedentes presentes na corrente sanguínea, hiperglicemia (MOON, 2001; POLAKOF & PANSERAT, 2015). Desta maneira, há a possibilidade de interação com o medicamento, que pode vir a influenciar positivamente no desempenho, massa, tamanho e comportamento da espécie em questão.

O procedimento de inserção da metformina na dieta de peixes já foi realizado anteriormente por administração intraperitoneal, com infusão por bomba de pressão osmótica e embutindo-a na própria

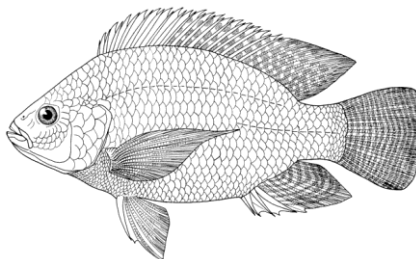
comida (HERTZ et al., 1989; POLAKOF et al., 2009; PANSERAT et al., 2009).

Os resultados das pesquisas citadas anteriormente possibilitou concluir que o mecanismo de ação da metformina em peixes é, provavelmente, similar ao que ocorre em mamíferos. A relevância da metformina foi constatada em carpas pelo incremento de glicose disponível durante os testes de tolerância, além de comprovação da inibição da gluconeogênese sem influenciar os níveis de insulina e glicose basais (HERTZ et al., 1989). Em trutas arco-íris, “espécie pouco tolerantes à glicose”, a metformina não influenciou em sua homeostase e suprimiu a ação da insulina (POLAKOF et al., 2009). Em outro estudo com trutas, reduziu a glicemia pós-prandial (PANSERAT et al., 2009).

Alguns estudos ressaltaram aspectos negativos emergentes da coexistência da metformina e animais de vida marinha, mais especificamente devido a evidências de sua conversão em guaniluréia (BRIONES et al., 2016). Em águas residuais gregas, Kosma et al. (2015) demonstrou em seu trabalho preocupação com a geração de guaniluréia (627 ng L^{-1} em efluentes), devido ao desconhecimento dos efeitos da exposição deste composto aos organismos marinhos, e a sua crescente disponibilidade mediante a biodegradação da metformina disponível no ambiente aquático. Niemuth e Klaper (2015) classificaram a metformina como um contaminante emergente e disruptor endócrino responsável por causar troca de sexo, especificamente por evidências de feminilização de machos, e diminuição da taxa de fecundação.

Alvo da pesquisa citada, dentre as espécies de peixes de maior potencial para a aquicultura está a Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* – Figura 3), que se destaca por sua representatividade no cenário comercial mundial, sendo a segunda maior cultura de peixes e a primeira do Brasil.

Figura 3. Representação de um exemplar de Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).



Fonte: Retirado de briancoad.com.

Esta espécie é originária do continente africano, possui alta capacidade de adaptação e fácil reprodução, além de sua carne branca ter muita qualidade. No Brasil, a produção de tilápia-do-nylo continua crescendo e concentra-se na região Sul-Sudeste, tendo maior consumo no Estado do Ceará. A produção brasileira escoia principalmente para os Estados Unidos e Espanha, com relação ao mercado externo (VICENTE, et al., 2014).

Uma característica de importância significativa no estudo é a presença de intestino alongado nesta espécie, que promove a utilização de aproximadamente 35 a 40% dos carboidratos digeridos. Sendo aproveitados mais eficientemente carboidratos complexos do que monossacarídeos e dissacarídeos (EL-SAYED & ABDEL-FATTAH, 2006).

2.2 ANÁLISE DE METFORMINA EM FLUÍDOS BIOLÓGICOS

2.2.1 Plasma e precipitação proteica

O plasma sanguíneo é a porção líquida do sangue. Representa por volta de 55 % de sua composição, em volume. Extrapolando para todas as espécies, o plasma contém uma variedade grande de substâncias solúveis em água, veículo que representa 90 % de seu volume. As substâncias solúveis em água contidas no plasma sanguíneo compreendem íons e sais minerais (cloreto de sódio, bicarbonato, ferro, cálcio, cobre, potássio etc.), compostos de baixa massa molar (açúcares, aminoácidos, nucleotídeos, vitaminas, hormônios, ácidos graxos, lipídeos, triglicerídeos, amônia, ureia, etc.), compostos de alta massa molar (peptídeos, proteínas, oligossacarídeos, polissacarídeos, oligonucleotídeos e polinucleotídeos) gases (oxigênio, gás carbônico, óxido nítrico entre outros) e metabólitos (SCHALLER et al., 2008).

A respeito das proteínas, estas representam 8% do volume do plasma sanguíneo. Há estimativas que indicam que haja mais de 40.000 variedades de proteínas no plasma sanguíneo, sendo as mais abundantes a albumina, globulina e o fibrinogênio (DO LOWE et al., 2004; SCHALLER et al., 2008).

Considerado um procedimento simples e rápido, a precipitação proteica, consiste no *clean-up* da amostra e possível quebra da interação/ligação do fármaco com a proteína, após a adição de um solvente orgânico ao qual induz a sua precipitação. A solubilidade da proteína é resultante de interações polares com o solvente aquoso, interações iônicas com sais e repulsão eletrostática entre seus resíduos e

moléculas de mesma carga. Em seu ponto isoelétrico, a carga líquida da proteína é igual a zero o que faz com que sua solubilidade seja mínima e este venha a precipitar (POLSON et al., 2003).

A grande maioria dos métodos de separação emprega a precipitação proteica na análise de compostos presentes em fluidos biológicos, assim como para a análise de metformina presente nestes tipos de matrizes (PONTAROLO et al., 2015; SCHERF-CLAVEL & HÖGGER, 2015; MOHAMED et al., 2015).

2.2.2 Métodos de análise de metformina em fluidos biológicos

Órgãos que fornecem informações técnicas para certificação da qualidade de fármacos, a farmacopeia britânica (BP) e americana (USP) (órgãos), recomendam respectivamente para a determinação de metformina em formulações farmacêuticas, a utilização de espectrofotometria ultra-violeta (UV) e cromatografia líquida com detector ultra-violeta (HPLC-UV) como metodologias de análise (U.S. PHARMACOPEIA, 2010).

Seguindo esta tendência, a técnica de maior incidência dentre os métodos de separação para este propósito é HPLC. Com a cromatografia líquida com detecção ultravioleta (HPLC-UV) Arayne et al. (2013) e Chhetri, et al. (2014) determinaram-na em soro e plasma humano. Assim como, os métodos implementados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) com Mistri et al. (2007) e LIU & COLEMAN (2009). A partir desta técnica foram reportados os menores limites de detecção e, além disso, a é a mais bem estabelecida na indústria de pesquisa farmacêutica para análise de medicamentos em matrizes biológicas (POLSON et al., 2003).

Complementarmente, outros métodos apresentam-se na literatura, mais especificamente técnicas de separação, para avalia-la em matrizes mais complexas, como por exemplo, fluidos biológicos. Os poucos trabalhos recentes empregando cromatografia a gás com detecção de ionização em chama (GC-FID) e cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) determinaram-na, após etapa de derivatização em metilglioal ou N-metil-bis-trifluoroacetamida (MBTFA), em colunas de 5-fenilmetilpolisiloxano (MADIJARU & KHUHAWAR, 2012; UÇAKTÜRK, 2013).

Em plasma, urina e soro de diabéticos há registro de determinações por eletroforese capilar de zona com detector ultravioleta (CE-UV), acoplada à espectrometria de massas (CE-MS) e com detector

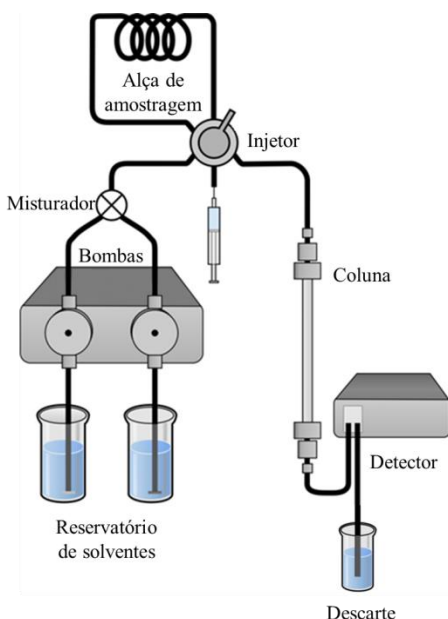
de condutividade sem contato (CE-C⁴D) (SONG, et al., 1998; ZNALEZIONA, et al., 2011; TUMA, 2014).

2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA ANÁLISE DE COMPOSTOS POLARES

O princípio de separação estabelecido em cromatografia é o de interações diferenciais do analito entre uma fase móvel e uma fase estacionária. Especificamente em cromatografia líquida a fase móvel apresenta-se em estado líquido, geralmente, uma combinação de solventes de polaridades distintas (SKOOG et al., 1997).

Atualmente a maior parte das aplicações da cromatografia líquida é via HPLC. A instrumentação de um HPLC convencional pode ser visualizada na Figura 4, evoluiu de acordo com a demanda de pressão exigida para o solvente percolar colunas preenchidas com partículas cada vez menores (SNYDER et al., 2011).

Figura 4. Esquema ilustrando as principais partes necessárias para a realização de análises por HPLC.



Fonte: Adaptado de elite.prompt.hu.

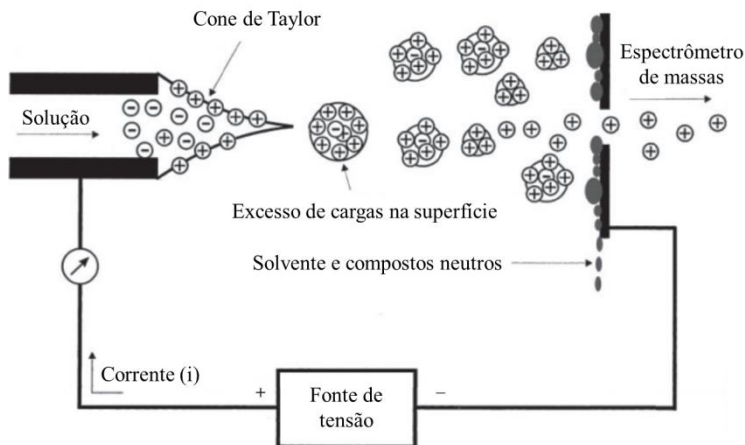
Por tal motivo, um HPLC é composto por um sistema de bombas responsável por dirigir solventes situados nos reservatórios de maneira gradiente ou isocrática fluxos de poucos mililitros por minuto. A composição é homogeneizada no misturador e dirigida pela tubulação para o injetor (manual ou automático) que é o meio de introdução de amostra, de volume limitado pela alça de amostragem. A amostra é direcionada a coluna, que acomoda a fase estacionária caracterizada por um aglomerado de partículas sólidas que caracterizam. Este é o seio da separação, onde os constituintes da amostra são segregados em tempos diferentes e encaminhados para o detector e o sinal é transmitido para o sistema de aquisição de dados (SKOOG et al., 1997).

Com relação ao acoplamento com o espectrômetro de massas, obrigatoriamente, uma interface é requisitada para viabilizar LC-MS. Visto que, um pré-requisito para análise por espectrometria de massas é a introdução de apenas compostos em fase gasosa no sistema. Além de que, em etapa posterior seja possível estabelecer uma trajetória estável no analisador de massas para a sua detecção.

Esta interface, além de, fazer a junção das duas técnicas, converte para o estado gasoso o que é direcionado ao espectrômetro de massas. Em LC-MS, isto inclui a fase móvel, os aditivos, caso presentes, e principalmente os analitos. Neste processo os analitos são também convertidos a íons em fase gasosa e por este motivo, a esta interface é atribuído o nome de fonte de ionização. As mais difundidas, cada qual com sua área de aplicação, são as fontes de ionização a pressão atmosférica (API) como: ionização por eletrospray (ESI), ionização química (APCI) e por fotoionização (APPI).

Sobre os aspectos específicos da ESI, o processo de ionização consiste primeiramente na concepção de um *spray* constante, constituído pelo líquido advindo do HPLC. A geração do eletrospray pode ser exemplificada a partir do observado no processo descrito na Figura 5 para a ionização de analitos positivos. Parâmetros utilizados para promover adequadamente o eletrospray são empregados na fonte de ionização, como: temperatura da fonte (TEM), voltagem, gás nebulizador (GS1) e secagem (GS2) (AB SCIEX, 2011).

Figura 5. Processo de formação do eletrospray e geração de íons em fase gasosa até o seu direcionamento para o espectrômetro de massas.



Fonte: adaptado de STANIFORTH & STRAVOS (2013).

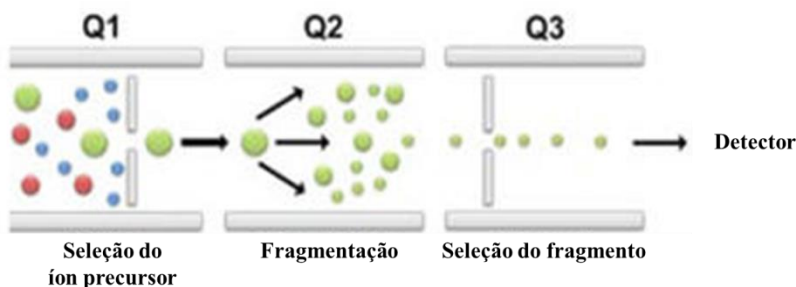
Uma redução do diâmetro da tubulação no interior da fonte de ionização, em comparação com a tubulação do HPLC, permite que o líquido seja dividido mais facilmente em sua extremidade. Esta fina tubulação, esta inserida em um compartimento metálico ao qual é aplicada uma diferença de potencial, promovendo na extremidade a deformação do escoamento do líquido para a forma cônica, este é denominado o Cone de Taylor. A partir deste fenômeno o eletrospray, composto por pequenas gotas carregadas e dispersas em um aerossol (REF). Com a ação de um fluxo de gás no interior da fonte de ionização, para a realização da secagem do líquido, a carga contida nas gotas passa a estar confinada em um volume cada vez menor. As forças de repulsão são tamanhas que vencem a tensão superficial e que ocasiona um colapso coulombico e da origem a nanogotas. Este processo acontece sucessivamente nas nanogotas até que, com a ação do gás de secagem o analito carregado passe para o estado gasoso e seja dirigido ao analisador de massas do espectrômetro. O íon gerado é chamado de quasi molecular, caracterizado por possuir m/z acrescida ou diminuída de uma unidade, ou seja, um próton $[M \pm H]$ (COLE, 1997)

Condições cromatográficas de fase móveis habituais influenciam no processo de ionização, assim como, substâncias presentes na matriz (efeito de matriz), por fenômenos de competição chamados de supressão, ou por efeitos positivos que promovem o aprimoramento da ionização (ANTIGNAC et al., 2005; GOSETTI et al., 2010). Para

minimizar o impacto destes efeitos nas análises de aplicação quantitativa, geralmente são aplicados padrões internos. Isto ocorre a partir da adição de um composto com similaridade estrutural que ao ser analisado junto do analito sua resposta seja utilizada como fator de normalização.

Diversos são os analisadores de massas, por exemplo, aprisionamento de íons quadrupolo, triplo quadrupolo, por tempo de voo. Tratando apenas do analisador de massas triplo quadrupolo, como pode ser visto na Figura 6, sua instrumentação é composta por três quadrupolos onde ocorre a análise da relação massa-carga (m/z).

Figura 6. Esquema do analisador de massas triplo quadrupolo. Representação de cada um dos quadrupolos (Q1, Q2 e Q3) e suas funções.



Fonte: Adaptado de mrmproteomics.com

O triplo quadrupolo é um analisador de massas composto por três quadrupolos cilíndricos representados por Q1, Q2 e Q3. Além destes, geralmente existe mais um quadrupolo, o Q0, responsável por focalizar e dirigir os íons por uma determinada trajetória sob a ação do potencial de entrada (EP). Em etapa anterior, no orifício de entrada para o Q0 é aplicado um potencial de desagregação (DP) para que aglomerados de íons sejam evitados, e também nesta etapa, resíduos de solventes e compostos neutros são removidos pelo gás de cortina (CUR) (AB SCIEX, 2011).

Em seguida, os outros três quadrupolos possuem funções bem específicas ou são espaços em que ocorre algum processo. Funções de segregar o íon precursor dos outros íons (Q1), fragmentar o íon selecionado (Q2) e selecionar o fragmento (Q3). As seleções ocorrem pela aplicação de diferenças de potenciais oscilantes entre os quatro cilindros que constituem o quadrupolo. Estes passam a ser instantaneamente polarizados para que somente íons de m/z específicos

permaneçam na trajetória para o próximo quadrupolo. No quadrupolo seguinte, o Q2, ocorre a fragmentação do íon precursor selecionado em Q1. O íon precursor é submetido a uma energia de colisão (CE), desde o Q0, que o acelera para chocar-se contra uma cortina de gás (CAD). Os fragmentos gerados são submetidos ao potencial de colisão na célula de saída (CXP) e, assim, selecionados no Q3 (AB SCIEX, 2011).

O triplo quadrupolo possibilita análises muito seletivas, visto que, o critério para percorrê-lo é bastante específico. Para exemplificar a característica seletiva este sistema permite a implementação do método de monitoramento de múltiplas reações (MRM), que consiste na seleção de m/z de um íon precursor e m/z de fragmentos e respostas são monitoradas para apenas as variações de massas pertinentes a este processo (AB SCIEX, 2011). A combinação deste método com a cromatografia líquida expande a capacidade de caracterização pelo tempo de retenção e pela transição específica de um composto.

Com relação ao desenvolvimento de método cromatográfico, diretrizes pré-determinadas para separar determinado grupo de analitos são recomendadas com relação a polaridade da fase móvel e fase estacionária empregadas. São chamados modos ou modalidades cromatográficas e as mais comuns são fase normal (NPLC) e fase reversa (RPLC) (SKOOG et al., 1997).

Entretanto, para a análise de compostos polares ambas apresentam falhas consideráveis. Em NPLC os compostos são pouco solúveis nos solventes empregados na fase móvel (SILVA, et al., 2016). A RPLC apresenta baixa seletividade para compostos altamente polares, devido aos analitos com estas características apresentarem-se pouco retidos nas condições de operação (ARAYANE et al., 2013; LANÇAS, 2010; TALLURI et al., 2012).

Agentes pareadores iônicos podem ser adicionados a fase móvel de fase reversa para proporcionar retenções satisfatórias a compostos polares (ZARGHI et al., 2003; VASUDEVAN et al., 2001). Em contrapartida, isto prejudica o acoplamento com a espectrometria de massas, pois a os pareadores comprometerem a resposta do analito por efeitos de competição na ionização, levando a uma importante supressão (LANÇAS, 2010; CHHETRI, et al., 2014).

Uma alternativa para a análise de compostos polares, incluindo a metformina, é a abordagem utilizando como modo de eluição a cromatografia líquida por interação hidrofílica (HILIC). Aparece como uma proposta inovadora e competitiva no cenário cromatográfico.

O acoplamento da espectrometria de massas com a cromatografia líquida é mais vantajoso, pois as fases móveis empregadas em HILIC

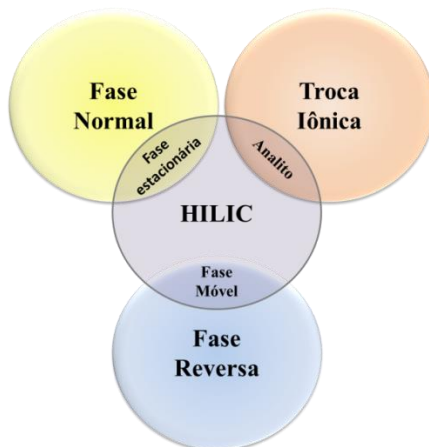
possuem grande contribuição de acetonitrila, um solvente orgânico polar aprótico que por suas interações intermoleculares de menor intensidade tem como característica tensões superficiais menores que, por exemplo, a água, o que possibilita maior eficiência na formação do eletrospray, o que proporciona uma melhor ionização e a utilização de maiores fluxos (SNYDER et al., 2011; CHHETRI et al., 2014).

2.3.1 Cromatografia líquida por interação hidrofílica

Uma proposição diferenciada, variante da fase normal, que possibilitou a separação e análise de substâncias altamente polares foi nomeada como HILIC em 1990, após Alpert resolver cromatograficamente proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos, oligonucleotídeos e carboidratos (ALPERT, 1990; ALPERT, 2011).

Os analitos separados por Alpert puderam ser eluídos com a seguinte estratégia: uma coluna polar hidrofílica percolada por uma fase móvel aquosa (5 - 40%) rica em solvente orgânico polar aprótico, acetonitrila (ACN). Em HILIC, o tempo de retenção diminui quanto maior a contribuição de solvente aquoso, a ordem de eluição é oposta a exibida em fase reversa (ALPERT, 1990). É uma modalidade que combinou características comuns a outros modos cromatográficos, exemplificado no exposto da Figura 7.

Figura 7. Características de outros modos cromatográficos comuns a HILIC.

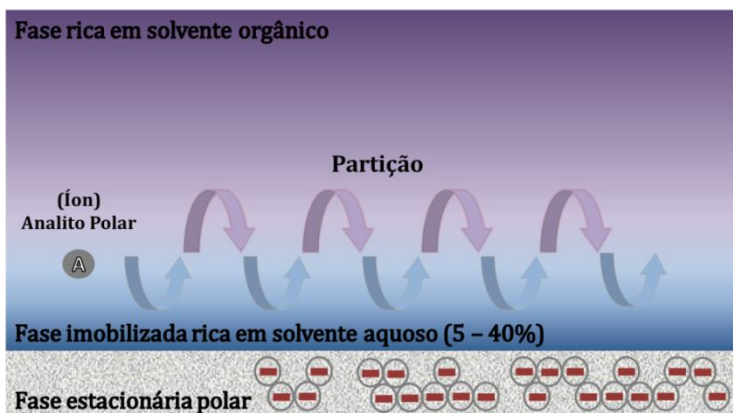


Fonte: adaptado de BUSZEWSKI & NOGA (2012).

Por exemplo: as fases estacionárias convencionais de fase normal (ciano, amino, sílica, etc.); as fases móveis comuns à fase reversa (considerando a limitação do solvente orgânico polar aprótico ser a ACN em HILIC); analitos polares (orgânicos e inorgânicos) que em sua grande maioria possuem carga e são analisados por cromatografia de troca iônica, exibiram alta compatibilidade em HILIC (TANG, et al., 2014; SILVA et al., 2016).

Mesmo depois de 27 anos de sua concepção, não há uma proposição concreta a cerca de um mecanismo de retenção universal que caracterize HILIC. Este permanece em discussão na literatura, muito provavelmente pela diversidade das estruturas químicas das fases estacionárias implementadas para a modalidade e a coexistência de múltiplas interações (TANG, et al., 2014). Porém, como pode ser visualizado na Figura 8, há uma teoria mais aceita que tenta justificar HILIC.

Figura 8. Ilustração da dinâmica proposta para o mecanismo mais aceito que rege separações HILIC.



Fonte: Autor.

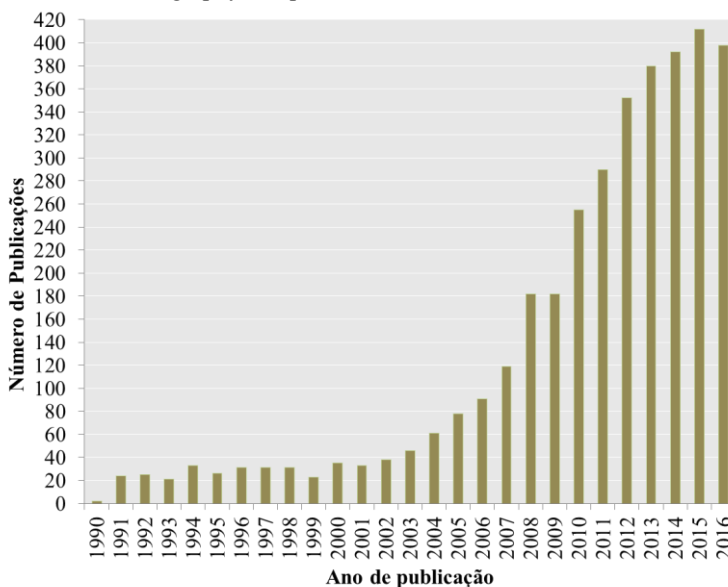
A proposta de mecanismo baseia-se na partição dos analitos na própria fase móvel. Mais especificamente, entre a porção aquosa miscível com solvente orgânico polar aprótico e a denominada “pseudo fase estacionária”, formada pela interação de moléculas de água em uma região muito próxima (superfície e poros) aos grupamentos hidrofílicos da fase estacionária (ALPERT, 1990). Quanto mais polar o analito mais

o equilíbrio de partição se desloca para a camada aquosa imobilizada, promovendo uma maior retenção (MELNIKOV et al., 2012; TANG, et al., 2014).

Uma particularidade deste modo, também documentada por Alpert (1990), é a participação de interações eletrostáticas significativas do analito com a fase estacionária quando a contribuição de ACN é igual ou superior a 70%. Configura uma modalidade mista de retenção dependente da natureza do analito e da fase estacionária, possibilitando intensidades diferentes para as interações. Podendo simultaneamente ocorrer entre o analito e a fase estacionária: interações coulombicas de atração e/ou repulsão, evidências de interações de hidrogênio, dipolo-dipolo, forças de *Van der Waals* (TANG et al., 2014).

O fato de a comunidade científica não dispor de amplo conhecimento sobre o mecanismo dessa modalidade, não provocou que o crescimento e a disseminação da HILIC fossem freados. De acordo com os dados extraídos da *Web of Science* o número de publicações até o ano de 2015 apresentou-se crescente, com 412 publicações (vide Figura 9).

Figura 9. Número de publicações com as palavras-chave “hydrophilic interaction chromatography” no período de 1990-2015.



Fonte: Autor, dados retirados do site *Web of Science*.

Bastante comum é o uso de aditivos, pHs e tampões na fase móvel para adequação de métodos HILIC, seja para atribuir uma determinada carga ao composto, melhorar simetria de pico e até mesmo manipular sua retenção. Um dos motivos do uso de aditivos é o de “blindar” as interações do analito com a sílica ionizada, proporcionando uma menor dispersão dos picos cromatográficos, causada por estes efeitos (SILVA et al., 2016). Métodos utilizando composições HILIC na análise de metformina podem ser visualizados na Tabela 1.

Dos métodos listados na tabela é possível destacar que as colunas de sílica predominam como escolha e estratégia para a separação da metformina na modalidade HILIC. As fases móveis concentram-se na aplicação de acetonitrila/água contendo formiato de amônio (HCOONH_4) como aditivo em uma faixa de concentrações de 2 – 25 mmol L^{-1} a um pH na faixa ácida, mais próximo de 3,0. Todos apresentam tempos de retenção curtos de 2,9 a 6 minutos. Além disto, em amostras de plasma, a partir de precipitação protéica com acetonitrila/ácido fórmico, os trabalhos demonstram que foi possível atingir bons níveis de recuperação de 81 – 101,8% e limites de quantificação de 0,5 a 50 ng mL^{-1} .

Com relação a fases estacionárias, diversas são utilizadas em HILIC e destacam-se: as neutras que podem encontrar-se carregadas negativamente (sílica, diol); as neutras que podem adquirir carga positiva: (amino); e as zwitterionicas (sulfobetaina) (HERMSTRON et al., 2013; XIONG & LIU, 2016). Outra possibilidade, até então pouco explorada devido a sua recém-concepção, é o emprego de fases estacionárias à base de ciclofrutano-6 nativo em separações HILIC. Até então não há na literatura métodos que empregam a FRULIC-N em análises quantitativas.

Tabela 1. Alguns exemplos de métodos e condições empregadas para análise de metformina por HILIC.

TÉCNICA (<i>t_r</i> , min).	AMOSTRA	COLUNA	FASE MÓVEL	PREPARO DE AMOSTRA	LOD LOQ (ng mL ⁻¹)	REC. (%)	REFERÊNCIA
LC-MS/MS (2,9)	Plasma humano	Atlantis HILIC Silica (150 × 2,1 mm; 3 µm)	0,4 mL min ⁻¹ de ACN (95:5)/H ₂ O (80:20), ambos 0,1% HCOOH, e 3 mmol L ⁻¹ HCOONH ₄	Precipitação proteica c/ ACN (0,1% HCOOH), vortex, centrifuga, filtração.	1,5; 5,0	89,2 - 93,0	PONTAROLO et al. (2015)
HPLC-UV (5,0)	Plasma de coelhos	Kromosil (250 × 4,6 mm; 5 µm)	1,0 mL min ⁻¹ de MeOH:PO ₄ ²⁻ (10 mmol L ⁻¹ ; pH 3,0) - (94:6)	Precipitação proteica c/ MeOH, vortex, centrifuga, filtração.	n.i; 160	97,3 - 102,2	MOHAMED et al., (2015)
LC-MS/MS (6,0)	Medicamentos herbais	Atlantis HILIC Silica (150 × 2,1 mm; 3 µm)	0,25 mL min ⁻¹ ACN:HCOONH ₄ . (25 mmol L ⁻¹ - pH 3,0) - (82:18)	Multietapas. Inclui uso de adsorventes e SPE.	2,0; 5,0.	76,2 - 91,2	XIMEI et al. (2012)
LC-MS/MS (3,0)	Plasma de rato	Luna Silica (50 x 2,0 mm; 3 µm)	0,4 mL min ⁻¹ ACN/H ₂ O (80:20) - 2 mmol L ⁻¹ HCOONH ₄ e 0,1% HCOOH	Precipitação proteica c/ ACN	n.i; 50	99,0 - 101,8	ZHANG et al., 2011
LC-MS/MS (4,0)	Plasma humano	Inertsil HILIC (150 x 2,1 mm, 5 µm)	0,65 mL min ⁻¹ ACN/H ₂ O - 0,1% HCOOH (30:70, v/v)	Precipitação proteica c/ ACN (0,5% HCOOH)	n.i; 0,5	81,0	LIU & COLEMAN, (2009)

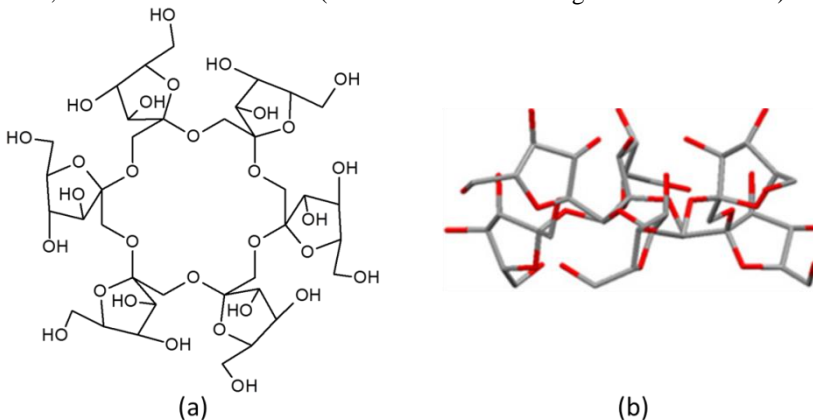
Fonte: Autor.

2.4 CICLOFRUTANO-6 COMO FASE ESTACIONÁRIA

Na cromatografia quiral, o emprego dos polissacarídeos como fases estacionárias ligadas foi bem sucedido e estabelecido, devido às diversas separações resolvidas utilizando as ciclodextrinas (XIAO, 2012). Seguindo a tendência de fases estacionárias ligadas, com base em polissacarídeos, foi introduzido o ciclofrutano-6 (CF6) (Figura 10 (a)), em uma investida de ampliar as possibilidades de separação enantiomérica utilizando cromatografia líquida.

A classe de compostos caracterizados como ciclofrutanos tem como particularidade serem oligossacarídeos macrocíclicos compostos de seis ou mais unidades de d-frutofuranose ligadas β (2 \rightarrow 1). O número seis, contido em CF6, refere-se à quantidade destas unidades, as quais se apresentam arranjadas em espiral formando um centro éter 18-coroa-6 (Figura 10 (b), um anel de dezoito membros contendo seis oxigênios) (SUN et al., 2010).

Figura 10. (a) Representação molecular e a (b) estrutura cristalina resolvida do CF6, no modelo de bastonetes (carbonos em cinza e oxigênios em vermelho).



Fonte: (a) Autor; (b) SUN et al., 2010.

O CF6 foi produzido pela pesquisa do grupo do professor Kawamura, ao fermentar a inulina na presença de algumas bactérias (*Bacillus circulans* OKUMZ 31B e *B. circulans* MCI-2554) ou ao incubar a inulina utilizando a enzima cicloinulooligosacarídeo frutanotransferase (CFTase) (KAWAMURA et al., 1989;

KAWAMURA e UCHIYAMA, 1994). Por estes procedimentos assegura-se a possibilidade de produzi-lo em grande escala e a um baixo custo, de maneira a ser viável a sua implementação como fase estacionária (QIU, et al., 2011).

A partir de 2010 começaram a ser reportadas sínteses das fases estacionárias baseadas em ciclofrutano-6 nativo e derivatizado, a fim de, avaliar o desempenho destas frente a separações quirais. Entretanto o desempenho do ciclofrutano-6 nativo na separação de moléculas quirais foi considerado limitado quando comparado às mesmas fases funcionalizadas com substituintes alifáticos e aromáticos (SUN et al., 2010).

Com relação à síntese de seus derivados após reação com grupo conector: “o ciclofrutano nativo pode ser ligado covalentemente a sílica e então derivatizado, ou previamente derivatizado para posterior ligação com a sílica”. (SUN et al., 2010; QIU, et al., 2011).

Em outra investida, foi comprovado seu potencial como ferramenta para separação de espécies polares, caracterizando-a como seletor aplicado a HILIC. O caráter hidrofílico desta molécula é atribuído à presença de múltiplos grupos polares, totalizando três hidroxilas, uma primária e duas secundárias, localizadas em cada um dos resíduos de d-frutanofuranose. (SUN et al., 2010; QIU, et al., 2011).

No modo HILIC de eluição foram reportadas com a coluna de ciclofrutano-6 nativo separações de aminoácidos, nucleotídeos e peptídeos (SHU et al., 2016;). Comprovada a sua eficácia na separação de espécies polares, a coluna a base de CF6 nativo passou a ser comercializada e recebeu o nome de FRULIC-N. Também foi sintetizada em suportes de diâmetro reduzido superficialmente poroso (núcleo rígido), e demonstrou ganho significativo em eficiência (DOLZAN, 2014). Recentemente, derivados do CF6 também tiveram sua aplicação em HILIC atestada como o derivado do CF6 com isopropil carbamato (LAHRIHC-P) e sulfonado (SCF6) (QIAO et al., 2016).

2.5 APLICAÇÕES DO AUTOAMOSTRADOR NO DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS

2.5.1 Análise por injeção em fluxo (FIA)

Um grande interesse de laboratórios de análises de rotina ou de escala industrial é aumentar o número de respostas em um período de tempo. Atualmente análises por injeção em fluxo (FIA) utilizando LC-

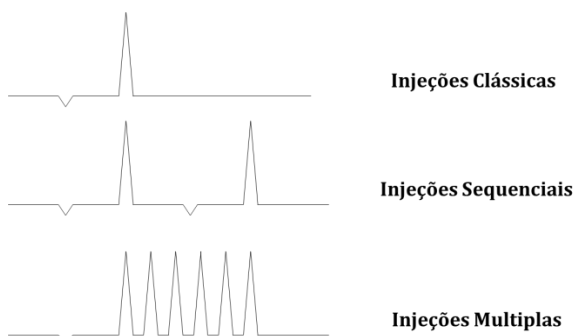
MS/MS são uma das opções com maior frequência analítica (tempo total de análise < 60 s). Por não necessitar de coluna cromatográfica, as análises acontecem graças ao desempenho autônomo do espectrometro de massas. Em FIA-MS os únicos papéis do cromatógrafo são o de carregar o analito em velocidade dependente do fluxo de fase móvel e introduzir a amostra, via autoamostrador (MICHEL et al., 2015; NANITA & KALDON, 2016).

2.5.2 Injeções múltiplas em um único experimento cromatográfico

WELCH, et al. (2010) introduziu o conceito de injeções múltiplas em uma única corrida experimental (MISER) ao conduzir análises cromatográficas (LC-MS/MS) com injeções consecutivas, de maneira a adquirir os dados em um único cromatograma (Figura 11). Comparando MISER com as análises convencionais, cada resultado é observado individualmente, nota-se desempenho superior em frequência analítica, econômica de solventes e praticidade no tratamento de dados.

A inovação não requer aquisição de novos componentes na instrumentação, o que facilita a sua disseminação pelas técnicas cromatográficas e eletroforéticas. (VISTUBA, et al., 2013; VITALI, et al., 2011). Entretanto a presença de um autoamostrador proporciona maior praticidade ao propiciar as injeções em momentos exatos. Mínimas separações cromatográficas são necessárias, permitindo uma análise rápida e segregada de compostos que poderiam potencialmente interferir na detecção de massas (WELCH, 2015).

Figura 11. Ilustração comparativa de três métodos de injeção diferentes. Uma maneira esquemática de apontar o aumento significativo da frequência analítica.



Fonte: Autor.

Ao executar um método convencional de injeções clássicas, o que é de costume, o término do tempo de análise é aguardado para que uma nova corrida cromatográfica seja iniciada e, partindo deste pressuposto as injeções sequências adicionam novas injeções ao final deste tempo decorrido em um mesmo cromatograma, enquanto que as injeções múltiplas são um método especial e mais complexo, que necessita ser otimizado em etapas progressivas de adições de plugues, para o aproveitamento da janela de injeções, representada pelo tempo de análise. Ainda mais, nos métodos cromatográficos o número de injeções é praticamente ilimitado e fica a critério do operador.

A eletroforese capilar fica limitada quanto ao número de injeções realizadas por MISER, pois, as duas extremidades ficam imersas em recipientes com soluções e no momento da injeção, ao introduzir um volume acima da capacidade de ocorrência de separação, o comprimento do capilar até a janela de detecção (L_{det} , em cm), este é rejeitado na extremidade oposta à injeção.

Uma particularidade das injeções múltiplas em HPLC é a sua sua limitação quanto a implementação em métodos que optam pela modalidade isocrática de eluição. Isto se dá pelo fato de as injeções ocorrerem de maneira sucessiva e rápida, o que faz com que mesmo que a resposta da bomba seja instantânea a condição administrada no método, ainda assim, ela é incapaz de ganhar da alta frequência de injeções. A consequência disto é a maior probabilidade de coeluições pela variação no tempo de eluição, ocasionado por condições continuamente alteradas na composição da fase móvel.

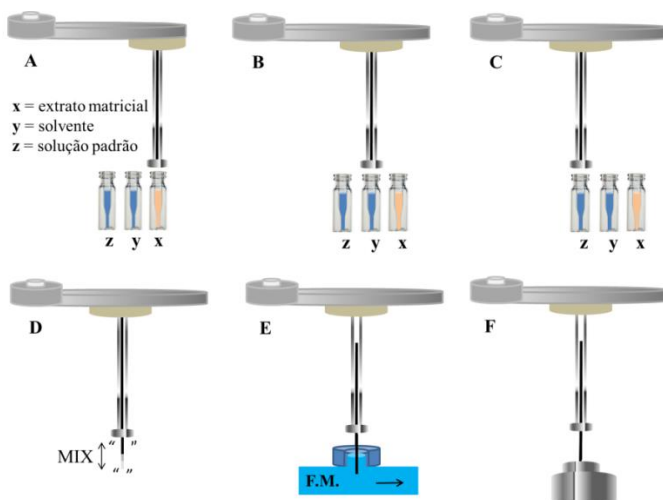
2.5.3 Adição automatizada pós-extração

A automatização dos sistemas de injeção (autoamostradores) aliou praticidade a possibilidade de programar análises sequenciais. Esta instrumentação agrega possibilidades que ficam a critério do analista, como por exemplo, desde escolher a solução a ser injetada, volume de injeção e a elaboração de soluções padrões mais diluídas a partir de uma estoque. Recentemente Rogers, et al. (2016) utilizando o autoamostrador de um LC-MS/MS reportou a adição automatizada pós-extração, *automated post-extraction addition* (APEA), intuito de avaliar o efeito de matriz de 31 drogas ilícitas presentes em urina. Consiste na co-injeção automatizada do extrato amostral e solução padrão misturados na seringa no momento antes a injeção, de modo a comparar as

respostas em área com a injeção de uma solução do analito em solvente puro.

É possível destacar nessa inovação o preparo na própria seringa do autoamostrador (Figura 12), fazendo uso das funções fornecidas pelos softwares. Há a utilização mínima do extrato amostral por injeção, o que confere maior usabilidade da matriz e a possibilidade de realização de análises em diversos níveis de concentração. Esta característica, ainda não explorada, possibilita a preparação automatizada de replicatas autênticas de curvas de calibração que fazem uso da matriz sem a interferência do operador.

Figura 12. APEA requer a aspiração de alíquotas das soluções x, y e z (A, B e C), a seringa mistura do conteúdo aspirado (D), posteriormente é lavada a parte externa em fase móvel (E) e, por fim, o conteúdo é injetado (F).



Fonte: Autor

2.5.4 Padronização interna com o próprio analito

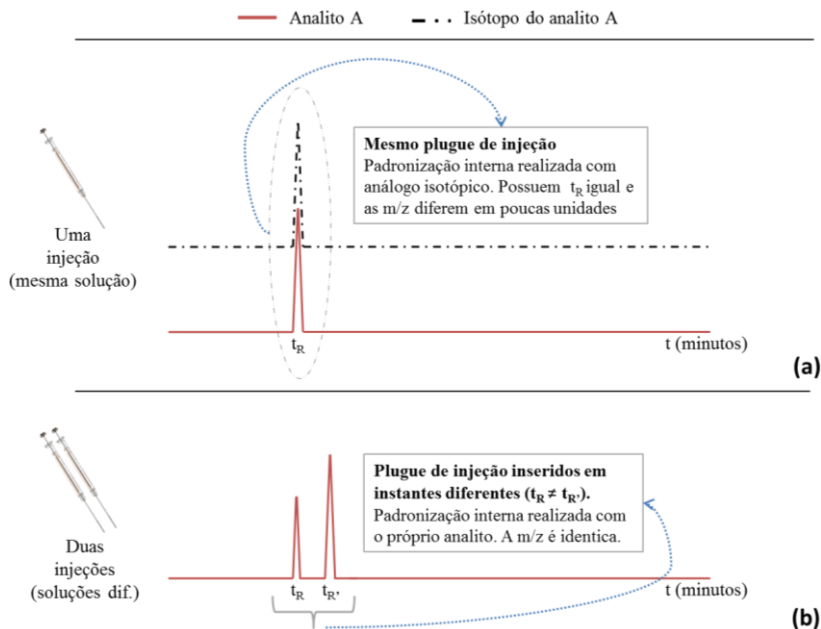
O LaBEC-UFSC lida em seu cotidiano com análises quantitativas fazendo uso do LC-MS/MS como ferramenta. Ao longo de diversos desenvolvimentos de métodos e validações ficou evidente a inconsistência na sensibilidade (coeficiente angular), em replicatas de curvas de calibração entre dias diferentes (inter-ensaio). Por sua elevada recorrência ficam comprometidas as inferências com relação a efeito de matriz e/ou problemas no aumento ou supressão da ionização.

Para contornar este problema e garantir análises quantitativas confiáveis, utiliza-se a padronização interna, com o intuito de normalizar os efeitos que provocam as variações constatadas, como os de supressão ou aumento da ionização de um determinado analito na fonte de ionização. Para tal, é necessária a escolha de um padrão interno adequado, que tenha alta pureza, não reaja com os componentes da amostra, principalmente os analitos, e ainda, possua características estruturais quanto mais semelhantes possíveis com o analito, o que permite um comportamento cromatográfico próximo ao da substância de análise.

Desta maneira, são muito utilizados como padrões internos (PI) em análises LC-MS os analitos marcados isotopicamente, como por exemplo, padrões deuterados (OOSTERHUIS, 2013; KRUBE et al., 2015). Padrões isotopicamente marcados possuem um custo associado a sua aquisição, uso muito restrito e específico à aplicação, limitações quanto à validade, acondicionamento e quantidade. A proximidade estrutural destes compostos com as substâncias que se deseja analisar é o que há de maior compatibilidade no mercado cromatográfico e espectrométrico, em termos de aplicação por similaridade estrutural Figura 13 (a).

O conceito de padrão interno externo ao plugue de injeção, do inglês *outer plug internal standard* (OPIS), introduzido pelo prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke (LabEC-UFSC), sugere a padronização interna aplicada em LC-MS/MS, pela utilização de um composto ideal, ainda mais similar em estrutura que os análogos isotópicos/deuterados, ou seja, o próprio analito.

Figura 13. Esquema representativo que explicita a comparação de duas maneiras de inserção do padrão interno exemplificados em cromatogramas distintos. Em (a) a injeção de uma solução contendo o analito A e o isótopo do analito A (linha tracejada), ambos possuem t_R igual e podem ser discernidos pela m/z diferente e, em (b) usa-se a padronização interna OPIS, o próprio analito é empregado como padrão interno e é introduzido por outra injeção, que não a da amostra, em momentos diferentes.



Fonte: Autor.

Todavia, uma quantidade de analito designada como PI não pode ser segregada, cromatograficamente, de seu teor já existente em uma amostra que o contem. OPIS opta por adiantar ou atrasar o analito atribuído como PI, por um método de injeções que as realize em tempos diferentes (vide Figura 13 (b)), para que a quantidade administrada deste PI não esteja incorporada em um mesmo pico cromatográfico da amostra e, sendo assim, possibilite a realização da razão de área do analito na amostra pela área do analito designado como PI, como demanda o conceito definitivo de padronização interna. O método de injeções diferenciado capaz de promover esta ação é, o já citado na seção 2.5.2 caracterizado por MISER.

Resumidamente, o OPIS faz alusão ao método de injeções múltiplas composto por inserções de plugues da amostra e do próprio analito como PI em instantes diferentes.

2.6 VALIDAÇÃO

No caso deste trabalho foram seguidas algumas recomendações expostas por Shabir (2003), HOFF et al., (2015) e Krueve et al. (2015) que em sua revisão auxilia a validação de métodos LC-MS/MS e, o documento denominado “Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica: Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários”, disponibilizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

2.6.1 Parâmetros de mérito

O objetivo da validação em um método analítico é o de atestar o cumprimento dos critérios para considerá-lo adequado em seu propósito. Os parâmetros de mérito ou de validação avaliados neste trabalho foram seletividade, linearidade, precisões, limite de detecção, limite de quantificação e recuperação.

2.6.2 Seletividade

Pretende-se com este parâmetro inferir a respeito da garantia de que a possibilidade de haver presença de interferentes não seja significativa a ponto de comprometer a análise do composto alvo, e o método seja capaz de distingui-lo tanto de outras substâncias presentes no corpo amostral quanto por grandezas associadas ao fenômeno intrínseco a análise.

A avaliação deste parâmetro é geralmente realizada por comparação da resposta para solução contendo o analito em meio amostral e em solvente puro caracterizado e avaliado também como efeito de matriz (HOFF, 2015).

2.6.3 Linearidade

Considerada a consequência da proporcionalidade das respostas analíticas com a concentração em uma determinada faixa. A faixa linear é o intervalo compreendido entre o nível mais baixo e o mais alto da calibração que se pode inferir com precisão e exatidão (SHABIR, 2003;

HOFF et al., 2015). Expresso por pelo menos cinco níveis de concentração, em triplicata, para a construção de curvas de calibração, visto que as respostas analíticas não são absolutas, estas precisam de um modelo matemático que a represente e retorne a concentração da amostra de interesse.

Algumas diretrizes aceitam a expressão da linearidade das curvas de calibração via coeficientes obtidos da regressão linear, como o de correlação, angular e linear, além da faixa linear. Entretanto é importante verificar os resíduos da regressão para que não haja uma tendência que promova bons valores para os coeficientes de correlação (BRASIL, 2011). Pode ocorrer de várias maneiras dependendo do propósito: como curva de calibração por padronização externa, padronização interna, superposição de matriz ou fortificação do extrato de matriz isenta e adição de padrão (HOFF et al., 2015).

2.6.4 Precisão

A precisão é uma estimativa da dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra ou padrões nas condições do método em um rigor estatístico para o número de repetições. Há variadas maneiras de expressá-la, dentre elas a repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Expressos pelo coeficiente de variação (CV) ou RSD.

Para a precisão instrumental ou repetibilidade de injeção a avaliação deve ser estudada dentre um mínimo de dez injeções do padrão de mesma concentração. A repetibilidade é a operação do método em um curto intervalo de tempo (intra-ensaio) avaliada em pelo menos três níveis de concentração em triplicata (KRUIVE et al., 2015).

2.6.5 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LOD) é denominado a menor concentração do analito que pode ser detectada nas condições empregadas no método. Enquanto que o limite de quantificação (LOQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis.

A interpretação literal das definições implica que em concentrações abaixo destes limites, não é possível fazer inferências com confiabilidade em relação ao analito ser detectável ou quantificável nas condições do método proposto (SHABIR, 2003).

São geralmente avaliados pela razão sinal-ruído de valor 3 e 10, respectivamente para o LOD e o LOQ ou por parâmetros da regressão (KRUIVE et al., 2015).

2.6.6 Exatidão

A exatidão é o valor mais próximo que um método pode propiciar frente a uma medida real. É possível acessá-la analisando uma amostra com concentração conhecida e certificada (BRASIL, 2011). Há também a possibilidade de comparar o valor com um procedimento alternativo bem caracterizado e estabelecido como exato. E por último, acessando a exatidão pelo ensaio de recuperação, ao adicionar concentração conhecida a uma amostra, quantificando a mesma e comparando o valor encontrado com o adicionado. Nas amostras são adicionados os padrões em triplicata e em três níveis de concentração. O procedimento de quantificação utilizado deve ser o mesmo implementado no método final (KRUIVE et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento e validação de um método de injeções múltiplas que alie a possibilidade de preparo de curvas de calibração de modo automatizado na própria seringa com padronização interna acessada pela inserção do próprio analito aplicado a determinação de metformina em amostras de plasma-de-tilápia do Nilo por HILIC-MS/MS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adequar condições espectrométricas para o monitoramento da metformina;
- Otimizar condições cromatográficas (porcentagem de acetonitrila, concentração e tipo de aditivo, pH, temperatura e vol. de injeção) de modo a adequar a separação da metformina utilizando a coluna de ciclofrutano-6 nativo (FRULIC-N) na modalidade HILIC;
- Desenvolver o método MISER empregando APEA e OPIS, afim de, avaliar a frequência analítica, possibilidade de realizar curvas de calibração mais reprodutíveis e que proporcionem fácil acesso na avaliação do efeito de matriz;
- Comparar método convencional com o proposto;
- Validar o método LC-MS/MS desenvolvido de acordo com efeito de matriz, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisões instrumental, intra-ensaio, intermediária e recuperação;
- Analisar e quantificar metformina nas amostras de plasma de tilápia-do-nilo, empregando o método validado.

4 EXPERIMENTAL

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Para diluições e composições de fase móvel foram utilizados reagentes com grau de pureza HPLC: metanol e acetonitrila ($\geq 99\%$ - Tedia, São Paulo, Brasil), formiato de amônio ($\geq 99\%$) e ácido fórmico (50% - Fluka Analytical, São Paulo, Brasil). A água ultrapura foi obtida a partir de um sistema Milli-Q, (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.) com resistividade mínima de 18,2 M Ω cm. Foi também utilizado tolueno grau P.A. (99% - Synth, São Paulo, Brasil) e o *terc*butilmetil éter grau HPLC ($\geq 99\%$ Tédia, São Paulo, Brasil) nos procedimentos cromatográficos. O cloridrato de metformina ($\geq 99,5\%$ - Pharmanostra, Goiás, Brasil) foi cedido pelo LABNUTRI.

Os estoques de soluções padrão foram preparados a partir de uma massa de 13 mg de cloridrato de metformina, diluída em 10 mL de ACN 50% (0,1 % ácido fórmico. Esta foi diluída até uma concentração de trabalho de aproximadamente 200 ng mL⁻¹. A fase móvel aquosa composta por formiato de amônio, teve seu pH ajustado utilizando uma solução de ácido fórmico 50%. As medidas de pH foram realizadas com o auxílio de um pHmetro digital.

4.2 INSTRUMENTAÇÃO

4.2.1 Condições cromatográficas e espectrométricas

Para o método proposto, foi utilizado um HPLC obtido da Agilent Technologies 1200 Series (Waldbronn, Alemanha) equipado com degaseificador *online* (G1322A), bomba quaternária (G1311A) que conduziu uma fase móvel gradiente de ACN:H₂O (10 mmol L⁻¹ HCOONH₄, pH 3,2) – 70:30 (v/v) a um fluxo de 0,5 mL min⁻¹. As separações cromatográficas foram realizadas em coluna AZYP FRULIC-N (Arlington, TX, EUA) com dimensões de 150 x 4,6 mm; 5 μ m, fase estacionária de ciclofrutano-6 nativo, suportada por sílica. Foi acomodada no compartimento de colunas com controle de temperatura independente (G1316A) a 40°C. Foram introduzidas no sistema 2 μ l das soluções e amostras utilizando um autoamostrador (G1367B), que possibilitou conduzir diferentes métodos de injeções, além da realização das curvas de calibração na própria seringa utilizando o procedimento MISER, APEA e OPIS.

Ao HPLC foi acoplado o espectrômetro de massas triplo quadrupolo Q trap 3200 com fonte de ionização ESI, Turbo V Ion Source/TurboIonSpray, (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, Canada). O nitrogênio (N₂) foi utilizado como gás. A ionização foi conduzida no modo positivo, resolução *Unit e* dwell time de 200 ms. O monitoramento de reações múltiplas (MRM) consistiu no acompanhamento das transições 130,2/71,1 e 130,2/60,1 m/z, respectivas à quantificação e confirmação.

O algoritmo automático de integração, modificação dos parâmetros instrumentais do sistema LC-MS/MS, bem como a aquisição de dados foram verificados com o auxílio do software Analyst 1.6.2. O excel foi utilizado para o tratamento estatístico, confecção de tabelas, plotagem das curvas e quantificação das amostras;

4.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

4.3.1 Otimizações dos parâmetros do espectrômetro de massas

Para aquisição de informações, a respeito da massa do íon precursor/fragmentos e suas energias ótimas (DP, EP, CE, CEP e CXP), foi utilizado o procedimento de infusão, com o objetivo de compor o método MRM. A introdução do analito foi conduzida com uma seringa de capacidade de 1,0 mL (4,6 mm d.i.) preenchida com solução padrão de metformina 500 ng mL⁻¹ (50% acetonitrila, 0,1 % ácido fórmico), tendo seu embolo pressionado por bomba acoplada ao espectrômetro, que proporcionou um fluxo de 10 µL min⁻¹. A *probe* foi mantida de acordo com recomendações do fabricante em 5,0 e 10,0 mm, respectivamente para as direções horizontal e vertical até o fim da infusão.

Para os valores dos parâmetros da fonte de ionização presentes na Tabela 2, à otimização foi experimentada via FIA. O ensaio foi realizado somente após a obtenção das condições ótimas de fase móvel. Um método LC-MS/MS específico foi realizado para esta finalidade, com injeções de 20 µL de metformina a 200 ng mL⁻¹, arrastadas pela fase móvel, a um fluxo de 500 µL min⁻¹.

Tabela 2. Valores variados para a otimização de cada um dos fatores da fonte de ionização e do analisador de massas.

Parâmetro	Valores
Gás de cortina (CUR, psi)	10; 20; 30.
Gás de colisão (CAD, psi)	Baixo; Médio; Alto.
Voltagem da <i>IonSpray</i> (V)	4000; 4500; 5000; 5500.
Temperatura da fonte (°C)	450; 500; 550; 600.
Gás nebulizador (GS1, psi)	45; 50; 55.
Gás de secagem (GS2, psi)	45; 50; 55.

Fonte: Autor.

4.3.2 Otimizações dos parâmetros cromatográficos

4.3.2.1 Porcentagem de acetonitrila

Foi verificado o efeito cromatográfico provocado por diferentes contribuições de acetonitrila na composição do eluente, variada com incrementos de 10% em uma faixa de 10 a 90% ($n = 3$). Enquanto o componente aquoso da fase móvel foi HCOONH_4 (25 mmol L^{-1}). Com isto, foram monitoradas as variações, expressas pelo fator de retenção (k), que pode ser calculado com auxílio da equação 1:

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (1)$$

onde t_r é o tempo de retenção e t_0 é o tempo do volume morto, ou tempo de eluição de um composto que não é retido pela fase estacionária, neste caso o terc-butilmetil éter (SKOOG, 2004).

4.3.2.2 Natureza e concentração do aditivo

Formiato de amônio (25 mmol L^{-1}) e acetato de amônio (25 mmol L^{-1}) foram avaliados como aditivos para a fase móvel. O aditivo selecionado foi preparado em quatro níveis de concentração 2, 5, 10 e 25 mmol L^{-1} e os impactos cromatográficos no fator de retenção (3) e assimetria de pico (A_s) avaliada pela equação 2:

$$A_s = \frac{DC}{CB} \quad (2)$$

em que C é o tempo de retenção, B e D são os tempos inicial e final para medidos a 10% da altura de um determinado pico de metformina.

4.3.2.3 pH

Os pHs avaliados ficaram restritos a faixa ácida para preservação da integridade da fase estacionária. De acordo com recomendações do fabricante da coluna a limitação de operação indica uso em pHs entre 3,0 a 7,0. Desta maneira foram avaliados os seguintes pHs 3,15; 4,1; 4,8; 5,1; 5,9 em função de k.

4.3.2.4 Temperatura

O comportamento cromatográfico foi avaliado a partir de variações de temperatura no compartimento de acomodação de colunas (15, 20, 25, 30, 35 e 40°C) em busca de aprimoramentos no perfil.

4.3.2.5 Volume de injeção

A última condição avaliada para o método foi o volume de injeção, avaliado em 0,5; 1,0; 3,0; 10,0; 20,0 μL , e a eficiência ou número de pratos (N) foi o parâmetro monitorado, e pode ser determinada por:

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w_b} \right)^2 \quad (3)$$

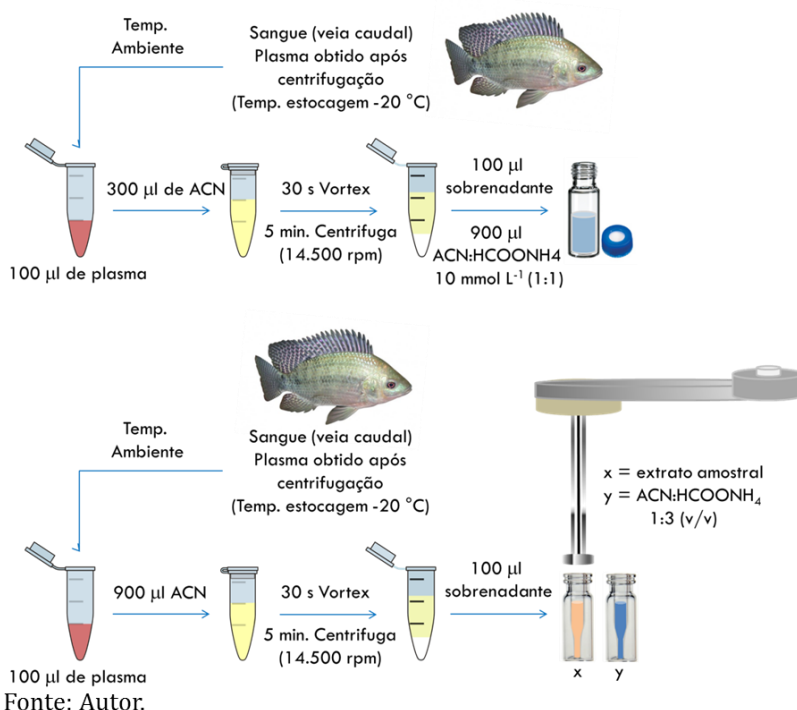
onde t_r é o tempo de retenção e w_b é a largura para um determinado sinal de metformina.

4.4 PREPARO DAS AMOSTRAS DE PLASMA

Dezesseis amostras de plasma foram fornecidas codificadas como M1 a M16, sendo oito amostras controle (24% e 48% de carboidratos - M2, M3, M5, M6, M9, M12, M14 e M16) e outras oito com suplementação do medicamento (24% e 48% de carboidratos + 0,2 % de metformina - M1, M4, M7, M8, M10, M11, M13 e M15). Cada uma composta de 1 mL de sangue da veia caudal de três indivíduos de cada uma das unidades experimentais, totalizando aproximadamente 3 mL, coletadas em quadruplicata pelo LABNUTRI.

Estas foram submetidas a procedimento de precipitação proteica, executado previamente à análise cromatográfica. As amostras foram retiradas do refrigerador e expostas à temperatura ambiente por cerca de 20 minutos antes de sua manipulação. O conteúdo foi agitado por 30 segundos em vortex, a fim de homogeneizá-las. Alíquotas foram transferidas separadamente para microtubos e misturadas com acetonitrila (0,1% ácido fórmico) em uma razão volumétrica de 1:9 (v/v). As soluções resultantes foram agitadas por mais 30 segundos e centrifugadas por 5 minutos a 14.500 rpm. Por fim, 100 μL do sobrenadante foram transferidos e adicionados 300 μL de uma solução 1:1 de ACN:HCOONH₄ (10 mmol L⁻¹) para assemelhar a composição da solução amostral com a fase móvel. Todo o procedimento resumido pode ser visualizado na Figura 14.

Figura 14. Ilustração referente ao procedimento adotado para o preparo das amostras de tilápia-do-nylo, de maneira manual, e automatizada (figura mais abaixo).



4.5 MÉTODOS DE INJEÇÕES MÚLTIPLAS (MISER)

Visando avaliar um método que possibilitasse frequência analítica maior, experimentando-o na análise das amostras e/ou padrões de calibração em um único cromatograma, investiu-se em MISER. As análises deste trabalho que se dispuseram deste método utilizaram a linha de comandos, os valores e as posições do autoamostrador na ordem expressa na Tabela 3. (a) Para cada ciclo de injeção desejado, a repetição dos comandos é recomendada, com exceção da função “espera” para o ultimo ciclo de injeção. Foram injetadas as soluções de recipientes contendo o extrato das amostras ou soluções de calibração preparadas em etapa prévia (bancada).

A realização das injeções múltiplas utilizando a co-injeção da solução padrão de metformina com o extrato do plasma (APEA), sucedeu-se por outra programação de comandos para o injetor automático como o descrito na Tabela 3 (b). Em um dos procedimentos a seringa aspirou as soluções (estoque padrão 200 ng mL^{-1} , acetonitrila e extrato matricial isento de padrão) em proporções diferentes para a preparação de curvas de calibração por superposição da matriz. Em outro, inspirado pelo procedimento APEA, foram preparadas na própria seringa soluções de calibração externa, sem a presença do extrato isento.

Por fim, ao método de calibração por superposição de matriz utilizando APEA foi incorporada a intercalação do OPIS (100 ng mL^{-1}) por diluições do estoque (200 ng mL^{-1}) com acetonitrila em presença da matriz com o programa do autoamostrador descrito na Tabela 3 (c).

A localização dos recipientes na bandeja do autoamostrador é expressa ao software de maneira a apontar qual bandeja, linha e a coluna. Por exemplo, o código P1-A-08 indica as coordenadas do recipiente localizado na bandeja 01, primeira linha (A) e oitava coluna.

Tabela 3. Linhas de comando, valores e posições, para programação de apenas um ciclo de injeção do autoamostrador. Respectivamente o emprego de MISER (a), APEA (b) e OPIS (c). (PX_n-Y_n-Z_n indica localizações genéricas de recipientes (*vials*)).

Tipo de Injeção		Função	Valor	Posição
MISER (a)		Aspirar/ <i>Draw</i> - solução (μl)	2,0	PX-Y-Z
		Lavar seringa/ <i>Neddle wash</i> (s)	10	<i>Flush port</i>
		Injetar/ <i>Inject</i>	-	-
		Espera/ <i>Wait</i> (min.)	0,5	assento
OPIS (c)	APEA (b)	Aspirar/ <i>Draw</i> - extrato amostra (μl)	0,5	PX _i -Y _i -Z _i
		Aspirar/ <i>Draw</i> - solvente (μl)	1,3	PX _j -Y _j -Z _j
		Aspirar/ <i>Draw</i> - padrão estoque (μl)	0,2	PX _k -Y _k -Z _k
		Misturar/ <i>Mix</i> (ciclos)	10	No ar/ <i>In air</i>
		Lavar seringa/ <i>Neddle wash</i> (s)	10	<i>Flush port</i>
		Injetar/ <i>Inject</i>	-	-
		Espera/ <i>Wait</i> (min.)	0,1	assento
		Aspirar/ <i>Draw</i> - extrato amostra (μl)	0,5	PX _i -Y _i -Z _i
		Aspirar/ <i>Draw</i> - solvente (μl)	0,5	PX _j -Y _j -Z _j
		Aspirar/ <i>Draw</i> - padrão estoque (μl)	1,0	PX _k -Y _k -Z _k
		Misturar/ <i>Mix</i> (ciclos)	10	-
		Lavar seringa/ <i>Neddle wash</i> (s)	10	<i>Flush port</i>
		Injetar/ <i>Inject</i>	-	-
		Espera/ <i>Wait</i> (min.)	0,1	assento

Fonte: Autor.

4.5.1 Magnitude das variações de injeção causadas pelo autoamostrador

O uso do padrão interno em uma injeção diferente da amostra pode ser considerado um procedimento controverso. Por este motivo foi avaliado com um cromatógrafo líquido com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) a variação proporcionada por injeções (n = 25) realizadas pelo autoamostrador em volumes de 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 μL de uma solução de tolueno. Este foi eluído a 1 mL min⁻¹ com MeOH (95%):H₂O (85:15), modalidade isocrática de eluição, em uma coluna Agilent Zorbax Eclipse Plus C-18 (4,6 x 150 mm; 5 μm) e monitorado

em 255 nm. Foi calculado o CV para as réplicas de cada uma das cinco medidas de volume como critério de avaliação.

4.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

4.6.1 Parâmetros de conformidade

A calibração do espectrômetro de massas foi realizada periodicamente ao longo do desenvolvimento do estudo, de acordo com procedimentos especificados pelo fabricante. A limpeza para manutenção da fonte de ionização e probe foi realizada em banho ultrassônico com solução de metanol (50%), e devidamente secas sob fluxo de gás nitrogênio (N₂).

O sistema de linhas tubulares e bombas do HPLC foram submetidas à eluição com álcool isopropílico, sob baixo fluxo, até observação de valores constantes na pressão do sistema e eliminação de possíveis bolhas. O assento do injetor e a seringa foram lavados com uma série de soluções e solventes, amônia (0,1%), acetonitrila (ácido fórmico 0,1%) e água deionizada em todos os dias da validação, a fim de minimizar o efeito causado pela presença de qualquer interferente.

A estimativa da conformidade do sistema, em termos da repetibilidade da área e tempo foi avaliada somente na precisão instrumental. Enquanto que a conformidade cromatográfica foi avaliada em termos do número de pratos (eq. 3), assimetria (eq. 2) e resolução (R_s), pela seguinte equação:

$$R_s = \frac{2 \cdot (t_{r_B} - t_{r_A})}{(w_{b_A} + w_{b_B})} \quad (4)$$

em que, no caso de MISER em específico, t_{rA} é referente ao tempo de retenção da espécie injetada em um primeiro instante e t_{rB} em um momento subsequente, w_{bA} e w_{bB} são suas respectivas larguras de base dos picos vizinhos (SKOOG, 2004).

4.6.2 Parâmetros de mérito

Parâmetros de validação ou de mérito avaliados para o presente método proposto foram: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão instrumental, precisão intra-ensaio, precisão intermediária e recuperação.

4.6.2.1 Efeito de matriz

Neste estudo, foram preparadas curvas de calibração externas e por fortificação do extrato de matriz branca, com sete pontos e em triplicata ($n = 3$). O efeito de matriz foi avaliado com teste F (Fisher-Sneadecor) e teste t-Student pertinentes, para um nível de significância de 95% ($\alpha = 0,5$), além disto, a razão dos slopes foi verificada como estimativa do efeito.

4.6.2.2 Linearidade

Foram verificadas a faixa linear experimental especificada para a calibração, delimitada pelas concentrações das soluções padrões contendo o analito, o coeficiente de determinação (R^2), a sensibilidade (coef. angular da regressão linear) e a significância da regressão verificada pelo teste F.

4.6.2.3 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do método foram calculados a partir das razões sinal ruído ($\frac{S}{N}$) médias ($n = 9$), referente a três níveis de concentração em triplicata (20, 80, 140 ng mL⁻¹) adicionados ao extrato matricial. Para o cálculo do LOD e LOQ admitiu-se o valor da uma razão sinal ruído de 3 e 10, respectivamente.

4.6.2.4 Precisões instrumental, intra-dia e intermediária

As precisões foram avaliadas com um único operador, padrões preparados no dia de cada ensaio e mensuradas utilizando o desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (eq. 5) tendo como parâmetro de resposta as áreas e os tempos de retenção dos picos referentes ao analito.

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (5)$$

A precisão instrumental ($n = 10$) foi avaliada com análises consecutivas de um mesmo nível de concentração de maneira sequencial e em um mesmo dia. A precisão intra-dia foi observada ao analisar o

analito em três níveis de concentração (20, 80, 140 ng mL⁻¹) e em três replicatas (n = 9) autênticas analisadas em sequencia. A precisão intermediária foi verificada em três níveis (20, 80, 140 ng mL⁻¹) de concentração com três replicatas autênticas (n = 9) em dias diferentes, ao longo de uma semana.

4.6.2.5 Ensaio de recuperação

O procedimento para avaliação da recuperação foi verificado com o preparo de alíquotas da matriz isenta precipitadas em três soluções para precipitação proteica em triplicata (n = 9), contendo cada uma delas aproximadamente 66, 100 e 200 ng mL⁻¹ de metformina em ACN (0,1% HCOOH). A última etapa de diluição foi realizada na seringa do autoamostrador de maneira simultânea ao procedimento APEA, antes da análise cromatográfica.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

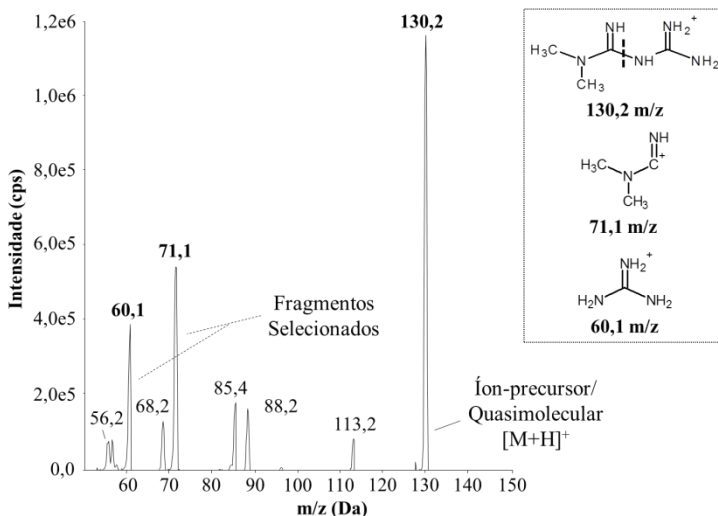
5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

5.1.1 Otimização dos parâmetros do espectômetro de massas

A infusão da solução de metformina no MS foi o ponto de partida do estudo. Para tal, foi necessário definir a polaridade operada na fonte de ionização, tendo como principal critério de escolha a natureza iônica do analito. Além de sua forma neutra, a metformina pode apresentar-se catiônica (cargas +2 ou +1), compreendendo os valores de pK_a 2,8 e 11,5 (HERNÁNDEZ et al., 2015). A abordagem no modo de polaridade positiva em detrimento da negativa justifica-se, pois, a metformina não assume formas carregadas negativamente.

A ionização branda do composto por ESI gerou seu íon quasmolecular, respectivo a sua massa molar ($129,07 \text{ g mol}^{-1}$) somada a uma unidade protônica $[\text{met}+\text{H}]^+$, e teve valor igual a 130,2 m/z. Os fragmentos mais abundantes do íon-precursor, também catiônicos, foram observados no processo de ionização, mais precisamente pela cisão da ligação simples C-N, ilustrada pelo pontilhado na Figura 15, gerando as espécies 71,1 e 60,1 m/z.

Figura 15. Espectro (MS2) obtido da infusão de uma solução de metformina.



Fonte: Autor.

Com a finalidade de aumentar a especificidade/seletividade do método espectrométrico foi selecionado o modo MRM, tendo em vista o monitoramento de respostas respectivas apenas às transições de m/z selecionadas ($m/z_{\text{íon precursor}} \rightarrow m/z_{\text{fragmento}}$). No procedimento de infusão, em posse de informações sobre as transições para a metformina, o software otimizou automaticamente as energias envolvidas no processo de ionização (parâmetros dependentes do composto – DP, EP, CE, CEP e CXP). O critério de escolha admitido pelo software é baseado na quantidade/contagem máxima de íons obtidos em função de uma energia específica aplicada (em volts). As condições ótimas encontradas para estes parâmetros encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Energias (DP, EP, CE, CEP e CXP) otimizadas para o processo de ionização das transições monitoradas para respostas relativas à metformina.

Transição	Energia (V)				
	DP ^a	EP ^b	CE ^c	CEP ^d	CXP ^e
130.2/71.1	36,0	4,0	25,0	12,0	4,0
130.2/60.1	36,0	4,0	17,0	12,0	4,0

DP^a = potencial de desagregação;

EP^b = potencial de entrada;

CE^c = energia de colisão;

CEP^d = potencial de entrada na célula de colisão;

CXP^e = potencial da célula de saída.

Fonte: Autor.

Foram duas as transições monitoradas, uma de quantificação e outra de qualificação (confirmação), respectivas a 130.2/71.1 e 130.2/60.1 m/z . As transições admitidas por este trabalho apresentaram-se em congruência (variações de m/z inferiores a 0,1 m/z) com as monitoradas nos métodos LC-MS/MS de Liu & Coleman (2009), Wu, et al. (2012) e Michel, et al. (2015).

Para os parâmetros da fonte de ionização independentes do composto (CUR, CAD, IS, TEM, GS1, GS2 e a posição horizontal e vertical da probe) foram utilizados valores recomendados pelo fabricante ao longo do desenvolvimento do método cromatográfico. O que ao fim do desenvolvimento do método cromatográfico demandou um ajuste para que a fonte de ionização ESI adegue-se a uma condição específica de fase móvel e promove-se desempenho e estabilidade

adequada a formação do spray e eficiência de dessolvatação das nanogotas.

Os valores recomendados apresentam-se dispostos apenas em função do fluxo de fase móvel, desta maneira, não compreendem valores adequados proporção de solvente aquoso/orgânico, a presença e concentração de aditivos empregados na composição da fase móvel. Para obter as condições ótimas em um tempo curto o procedimento foi conduzido em FIA. Os parâmetros otimizados estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5. Valores ótimos para os parâmetros da fonte de ionização independentes do composto.

Parâmetro	Valor
Gás de cortina (CUR, psi)	20
Gás de colisão (CAD)	alto
Voltagem da Ionstray (V)	4000
Temperatura da fonte (TEM, °C)	600
Gás nebulizador (GS1, psi)	50
Gás de secagem (GS2, psi)	50
Probe x e y (mm)	4, 3

Fonte: Autor.

5.1.2 Otimização do método cromatográfico

Inicialmente, o volume de fase móvel convencional dispendido no pré-condicionamento de colunas HPLC (20 volumes) mostrou-se insuficiente, pois as observações de t_r não mantiveram-se constantes. O volume de exposição à fase móvel foi variado até a obtenção de repetição desejável. Valores condizentes foram alcançados após 30 minutos com uma vazão de $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ (pressão < 300 Bar). Equivalente a um dispêndio de 75 mL de fase móvel e 30,1 volumes preenchidos da coluna FRULIC-N quando houver a necessidade de alteração de condições de fase móvel.

Outra questão que prolongou o desenvolvimento do método cromatográfico foi a constatação de que variações ao acaso da composição da fase móvel resultaram em picos com baixa eficiência e desvios da distribuição gaussiana. Para contornar este problema, foi realizada uma sistematização univariada para averiguação das condições

de fase móvel capazes de promover o adequado perfil cromatográfico dentro o domínio experimental averiguado.

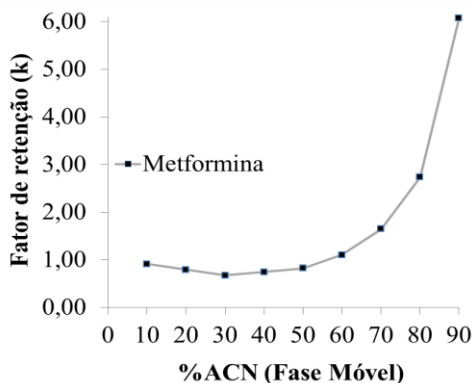
5.1.2.1 Porcentagem de solvente orgânico

Grande parte dos métodos reportados referentes à HILIC apresenta a acetonitrila como solvente polar orgânico aprótico para compor a fase móvel (SILVA, et al., 2016; XIONG & LIU, 2016). Não somente a sua popularidade foi critério para sua escolha no presente trabalho, outros foram relevantes, visto que o método visa acoplamento com um MS e, um solvente que beneficie a técnica é muito bem vindo.

No processo de ionização a acetonitrila possibilita melhor eficiência e estabilidade na formação do nanospray que, por conseguinte, promove mais os íons ao estado gasoso. Isto se dá pela tensão menor ocasionada pela ausência de interações intermoleculares via ponte de hidrogênio. Neste solvente também são solúveis grande parte dos solutos/aditivos das fases móveis de HILIC.

Sua influência no comportamento cromatográfico da metformina pode ser observada na Figura 16.

Figura 16. Variação da composição da fase móvel, entre 10 e 90% (v/v), em termos da porcentagem de acetonitrila na retenção (k) da metformina. (Condições do experimento coluna FRULIC-N (4,6 x 150 mm; 5 μ m), 25°C; solvente complementar: solução de formiato de amônio 25 mmol L⁻¹; inj. 5 μ L de solução padrão de metformina de 50 ng ml⁻¹; marcador de t₀ = terbutilmetil éter, valor 3,0 minutos).



Fonte: Autor.

Pela interpretação do perfil da Figura 13 observa-se que na faixa que compreende de 50% a 90% de ACN há um aumento na retenção do analito. Por definição, as fases móveis de HILIC proporcionam este comportamento em teores de ACN superiores a 60% (ALPERT, 1990; LANÇAS, 2010). A metformina ao eluir pela fase estacionária de ciclofrutano-6 exibiu um perfil de retenção típico de HILIC, com deslocamento que tolera 10% a mais de ACN na fase móvel.

Foi verificada que a intensidade (contagem dos íons) diminuiu drasticamente conforme maior contribuição de solvente aquoso. Desta maneira, a condição de compromisso selecionada dentre a faixa que compreende a retenção HILIC para a FRULIC-N (50% a 90%) foi, tal que, aliasse intensidade adequada em um tempo total de análise inferior a 10 minutos. Em 70% de acenitrila estas condições foram respeitadas.

5.1.2.2 Natureza e concentração de aditivo

Os aditivos utilizados nas fases móveis de HILIC-MS/MS precisam ser selecionados de maneira que não interfiram na análise, portanto é preciso que sejam voláteis na temperatura de trabalho da fonte de ionização (TANG et al., 2014). Em HILIC acetato de amônio e formiato de amônio são bastante empregados para controlar o pH e a força iônica da fase móvel (BUSZEWSKI & NOGA, 2012).

Resultados utilizando o acetato de amônio como aditivo foram semelhantes aos observados com o formiato de amônio, no mesmo nível de concentração. Por praticidade no preparo das soluções optou-se pelo formiato de amônio, disponível em padrão sólido de alta pureza. Algumas das alterações cromatográficas podem ser observadas com a variação da sua concentração podem ser observadas na Tabela 6.

Da avaliação do teor de formiato de amônio, pode-se observar uma diminuição na retenção conforme o aumento da força iônica. Esta diminuição é pouco pronunciada, mas é geralmente atribuída aos efeitos de blindagem, provocados pela interação eletrostática do íon amônio (NH_4^+) com os silanóis residuais e aos grupos aniônicos presentes na fase estacionária. Isto minimiza a intensidade das interações da metformina (catiônica) com a fase estacionária.

Segundo Buszewski e Noga (2012) quando o aumento de concentração de aditivo provoca a diminuição da retenção do analito, há evidências que a retenção é regida, majoritariamente, por um mecanismo troca iônica.

Tabela 6. Valores observados para a simetria e fator de retenção ao variar a concentração (mmol L^{-1}) de formiato de amônio na composição da fase móvel. (Condições do experimento coluna FRULIC-N (4,6 x 150 mm; 5 μm), 25°C; ACN:H₂O (70:30); inj. 5 μL de solução padrão de metformina de 50 ng mL^{-1} ; marcador de t_0 = terbutilmetil éter, valor médio de 3,1).

Conc. [NH_4] (mmol L^{-1})*	t_r	k	Assimetria (A_s)
2	9,48	2,06	1,4
5	8,19	1,64	2,0
10	8,20	1,65	1,2
25	7,86	1,53	1,8

Fonte: Autor.

A consequência imediata observada com a adição do amônio no sistema foi a redução do alargamento desproporcional dos picos. A concentração de 2 mmol L^{-1} de formiato de amônio foi desconsiderada como opção ao promover aleatoriamente, ombros e duplicação de picos referentes a metformina por fenômenos não evidenciados.

Os valores observados para a assimetria são considerados satisfatórios de 0,8 a 1,2, e puderam ser alcançados somente com quando 10 mmol L^{-1} de formiato de amônio foi adicionado a ambas as soluções da fase móvel e, portanto, este foi selecionado. Concentrações mais elevadas não foram avaliadas para que a ionização do analito não fosse prejudicar por efeitos de supressão da ionização.

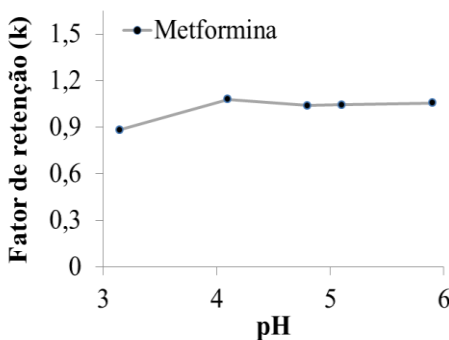
5.1.2.3 pH

Alterações no pH da fase móvel podem provocar mudanças na estrutura/carga tanto do analito quanto do grupamento da fase estacionária. A influência do pH no equilíbrio de espécies para a metformina foi demonstrada por Hernández, et al. (2015) e está demonstrada na Figura 2 da seção respectiva a revisão da literatura.

Uma informação adquirida com o fabricante da fase estacionária é a de que não foram realizados testes de estabilidade em função do pH. Sabe-se, porém, que fases estacionárias de sílica, em sua grande maioria, limitam-se a fases móveis aquosas com pHs não muito elevados e nem muito baixos, entre 2 a 8 (SNYDER, et al., 2011).

Portanto, o domínio experimental admitido para a avaliação do comportamento cromatográfico da metformina ficou restrito apenas a esta faixa com a variação de uma unidade para cada extremo (3 a 7) para garantir a integridade da fase estacionária. Esta avaliação pode ser visualizada na Figura 17.

Figura 17. Variação de k observadas para valores de pH entre 3 e 6 empregados na fase móvel aquosa.



Fonte: Autor.

Esta definição da faixa de pHs, como o esperado, não provocou a variação do fator de retenção expressiva para a metformina, muito porque em toda a faixa de pHs avaliada a metformina apresenta-se monoprótica. Além do que, o pH da fase móvel foi controlado apenas no solvente aquoso, o qual contribuiu somente com 30% da composição do eluente. Ao ser misturado com acetonitrila para formar a fase móvel, o pH resultante é acrescido significativamente. A solução de pH 3 foi a de menor nível, entretanto por tratar-se de um eluente composto por uma mistura com acetonitrila na proporção 70:30, o pH termodinâmico disponível na literatura é superior a 5.

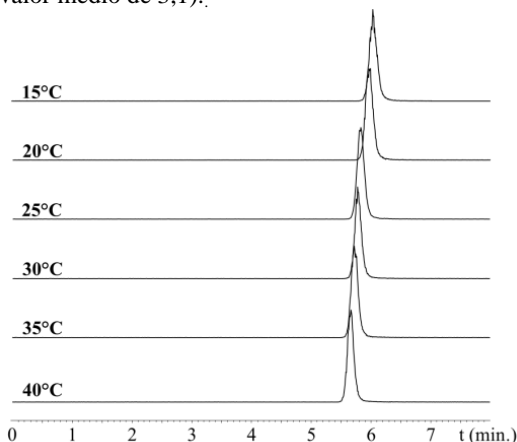
Portanto, os pHs avaliados concentraram-se em uma faixa muito estreita e próxima, por este motivo, não foi verificada variação do fator de retenção pronunciada.

O pH 3,2 foi selecionado como condição de compromisso, porque promoveu a eluição do analito em tempo de retenção inferior as outras condições estudadas.

5.1.2.4 Temperatura

Alterações da temperatura podem promover modificações na maneira como um líquido escoou. Mais especificamente, a viscosidade do eluente pode ser alterada, mediante a temperatura imputada a coluna. Este efeito pode ser visualizado nos cromatogramas da Figura 18.

Figura 18. Modificações na temperatura do compartimento de acomodação termostaticado e o efeito provocado no t_r para a metformina. (Condições do experimento coluna FRULIC-N (4,6 x 150 mm; 5 μ m), 0,5 ml min⁻¹ (70:30) ACN:H₂O (solução aquosa pH 3,2), ambos 10 mmol L⁻¹ formiato de amônio ; inj. 5 μ L de solução padrão de metformina de 50 ng ml⁻¹; marcador de t_0 = tercbutilmetil éter, valor médio de 3,1).



Fonte: Autor.

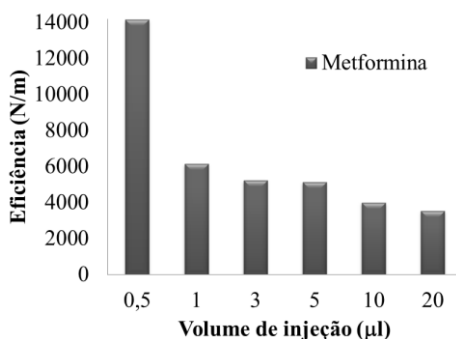
Com interpretação do exposto na figura acima verifica-se que a retenção da metformina foi influenciada por variações na temperatura da FRULIC-N, mesmo que de maneira pouco pronunciada. Com estas adequações foi possível acelerar apenas 0,2 min. e houve um pequeno ganho em simetria, em relação à temp. de 25°C, ao selecionar 40°C como temperatura de compromisso para a análise cromatográfica.

5.1.2.5 Volume de injeção

A variação do volume de injeção em um método pode promover ganhos significativos nos limites de detecção e quantificação alcançados. Entretanto há uma limitação quanto a tolerância da coluna

para volumes injetados. Colunas com 4,6 mm d.i., geralmente, toleram até 20 μl sem perda significativa de eficiência por sobrecarga de analito no sistema cromatografico. Para a metformina na coluna de ciclofrutano pode ser observado o perfil da Figura 19.

Figura 19. Valores de $N\text{ m}^{-1}$ em função da variação no vol. de injeção. (Condições do experimento coluna FRULIC-N (4,6 x 150 mm; 5 μm , 40°C), 0,5 ml min^{-1} (70:30) ACN:H₂O (solução aquosa pH 3,2), ambos 10 mmol L^{-1} formiato de amônio ; inj. 5 μL de solução padrão de metformina de 50 ng ml^{-1} ; marcador de t_0 = tercbutilmetil éter, valor médio de 3,1).

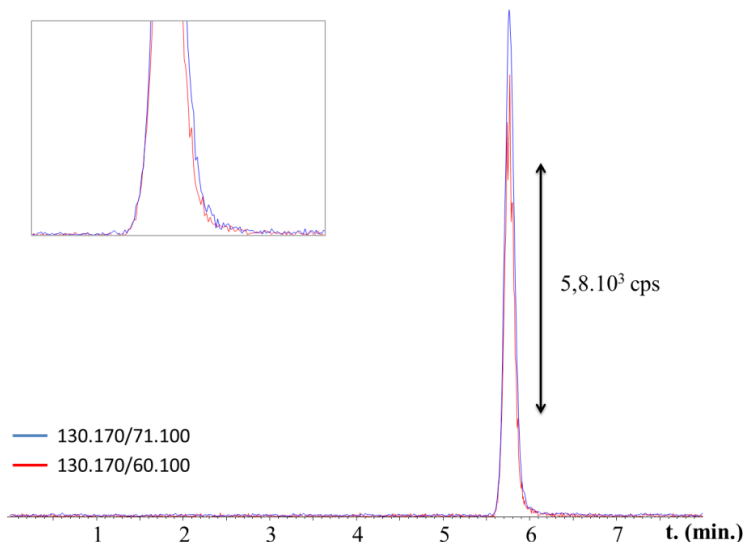


Fonte: Autor.

A variação do numero de pratos em função do volume injetado de solução de metformina propiciou verificar que a fase estacionária exibe variação sensível quanto maior for o volume administrado no método. O volume selecionado como o de compromisso foi o de 2,0 μl , esta escolha foi impulsionada pela aplicação do preparo automatizado das curvas de calibração, já que foi necessário disponibilizar volume suficiente para que pudessem ser aspirados volumes para reproduzir as soluções de concentrações mais altas, utilizando uma mesma solução estoque “mãe”.

Ao fim do aperfeiçoamento do método cromatográfico e determinados os parâmetros ótimos para a metformina obteve-se o seguinte cromatograma para a amostra M8, que pode ser visualizado na Figura 20. Em aproximadamente 5,7 minutos ($k = 0,9$), foi alcançada uma simetria de 1,1 e eficiência de 6161 $N\text{ m}^{-1}$.

Figura 20. Cromatograma (LC-MS/MS) obtido pela injeção de 2 μL da amostra M8 contendo metformina, eluída a $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ em uma fase móvel de ACN:H₂O (10 mmol L^{-1} - pH 3,2) na proporção de 70:30 em modo isocrático na FRULIC-N (40°C).



Fonte: Autor.

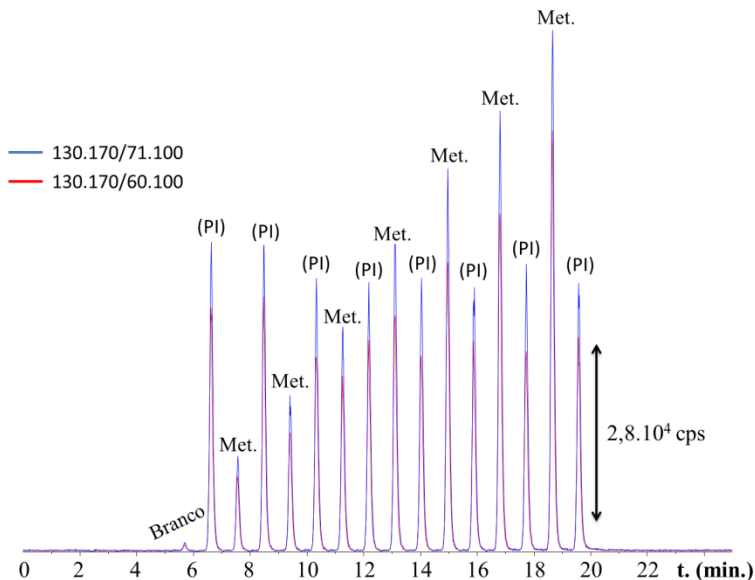
5.2 MÉTODO DE INJEÇÕES MÚLTIPLAS COM PREPARO AUTOMATIZADO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO NA SERINGA DO AUTOAMOSTRADOR E PADRONIZAÇÃO INTERNA COM O PRÓPRIO ANALÍTO

A adesão de uma injeção a mais de metformina, ao cromatograma da Figura 20, foi a estratégia inicial para a familiarização com o método MISER, para que em um segundo momento fosse feita a inserção de mais injeções. O requisito para a injeção do segundo plugue de metformina foi descobrir o tempo necessário para promover um distanciamento que proporcionasse uma resolução maior ou igual a 1,5. Para tal, informações auxiliaram nas condições de partida para o método MISER, como o t_r de 5,7 minutos, a largura de base (w_b) de 0,4 a 0,7 min. para os picos de metformina, o tempo de exposição da seringa na *flush port* de 10 s e, além de, o tempo suficiente para o autoamostrador completar um ciclo de injeção realizado de aproximadamente 16 a 18 s.

Até o nível de concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de metformina foi exigido que para a introdução de um novo plugue, fosse inserida a função de espera de 0,50 minutos na programação do autoamostrador, entre a primeira injeção e o aspirar da segunda. Enquanto que para os procedimentos que incluem APEA e OPIS este tempo foi inferior, 0,10 minutos, já que a existência de um número maior de comandos exigidos para o método consome mais tempo entre corridas.

O resultado pode ser observado na Figura 21, no cromatograma referente ao método que incorporou a realização de uma curva de calibração por fortificação do extrato de matriz isenta injetada simultaneamente com a solução padrão de metformina (APEA), utilizando MISER para intercalar o OPIS de maneira totalmente automatizada.

Figura 21. Curva de calibração por fortificação do extrato da matriz isenta ($20 - 140 \text{ ng mL}^{-1}$) com picos intercalados do analito desempenhando a função de padrão interno (80 ng mL^{-1}) preparados na seringa do autoamostrador por programação via software (LC-MS/MS). (Condições do experimento coluna FRULIC-N ($4,6 \times 150 \text{ mm}$; $5 \mu\text{m}$, 40°C), $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ (70:30) ACN:H₂O (solução aquosa pH 3,2), ambos 10 mmol L^{-1} formiato de amônio; inj. $2 \mu\text{L}$).



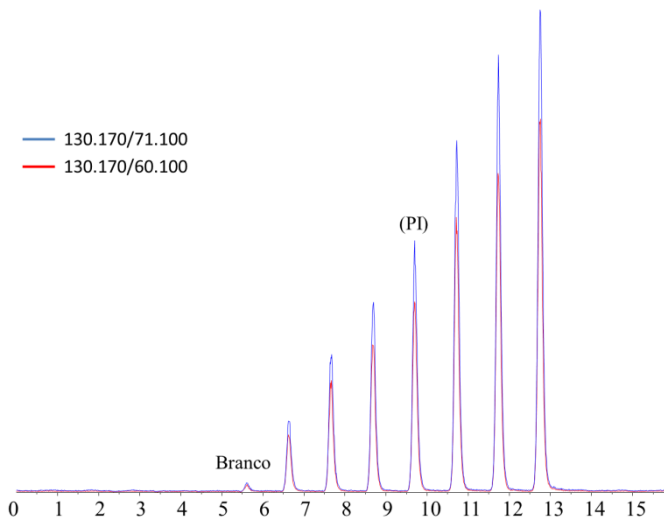
Fonte: Autor.

Neste método, cada pico representa uma única injeção, e com isto foi alcançada uma resolução média entre picos vizinhos de 1,6. É possível introduzir um número de injeções que fica a critério do operador, entretanto, foram realizadas 16 injeções, caracterizando a possibilidade de construção de uma curva de calibração com 8 níveis de concentração (contando com o branco) ou a análise de 8 amostras, ambos intercalados pelo analito como padrão interno, em tempo de análise inferior a 20 minutos. Comparativamente o método convencional de injeções dispenderia de aproximadamente 48 minutos para realizar o mesmo procedimento, o que caracteriza 2,4 vezes mais tempo.

A intercalação dos picos do analito com o padrão interno foi de realizada de maneira estratégica desejando que as correções por normalização fossem as mais corretas. Ou seja, a injeção do padrão interno em um momento muito próximo a injeção do analito retrataria com mais fidelidade às condições da fonte de ionização. Esta prática foi realizada principalmente com o intuito de promover maior repetitividade nos resultados expressos pelo método entre dias diferentes de análise.

Entretanto, ao final foi observado que o valor para a área dos picos atribuídos como padrão interno variou pouco numa mesma corrida. Desta maneira, admitiu-se uma nova estratégia pensando na possibilidade de utilizar a área de um dos níveis de concentração da curva de calibração como fator normalizador. Portanto foi selecionado o nível de concentração intermediário da curva de calibração, que é de 80 ng ml^{-1} , indicado na Figura 22.

Figura 22. Curva de calibração ($20 - 140 \text{ ng mL}^{-1}$) por fortificação do extrato da matriz isenta, preparada de maneira automatizada na seringa do autoamostrador (LC-MS/MS), empregando padronização interna com o analito em um nível de concentração de 80 ng mL^{-1} (PI). (Condições do experimento coluna FRULIC-N ($4,6 \times 150 \text{ mm}$; $5 \mu\text{m}$, 40°C), $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ (70:30) ACN:H₂O (solução aquosa pH 3,2), ambos 10 mmol L^{-1} formiato de amônio; inj. $2 \mu\text{L}$.)



Fonte: Autor.

Ao estabelecer as condições do cromatograma da maneira apresentada na Figura 22 foi avaliada a repetitividade observada para os coeficientes angulares das curvas obtidas e estabelecida a comparação do efeito com e sem o tratamento via OPIS. Esta verificação foi realizada, pois, a repetitividade é um fator importante para se levar em conta nas análises de rotina em LC-MS/MS. Trabalhos anteriores do LabEC-UFSC demonstraram grande flutuação para curvas de calibração realizadas em dias. Desta maneira a comparação foi realizada via CV (%) e valores do teste F observados para a ANOVA fator único em cada um dos tratamentos elencados na Tabela 7.

Tabela 7. Avaliação do efeito do uso da padronização interna utilizando o próprio analito (OPIS) entre diferentes dias por comparação dos CVs e tratamento estatístico por ANOVA fator único ($\alpha = 95\%$).

#	Dias			$\bar{X}_{\text{coef.fang.}}$	$\sigma_{\text{coef.fang.}}$	Valores	
	1	2	3			CV (%)	$F_{\text{calculado}}$
Sem OPIS	$y = 3,12 \cdot 10^3 x + 9,30 \cdot 10^3$ $R^2 = 0,998$	$y = 4,08 \cdot 10^3 x + 1,73 \cdot 10^3$ $R^2 = 0,998$	$y = 4,52 \cdot 10^3 x + 2,48 \cdot 10^4$ $R^2 = 0,993$				
	$y = 3,17 \cdot 10^3 x + 8,80 \cdot 10^3$ $R^2 = 0,998$	$y = 4,20 \cdot 10^3 x + 7,43 \cdot 10^3$ $R^2 = 0,997$	$y = 4,56 \cdot 10^3 x + 2,45 \cdot 10^4$ $R^2 = 0,995$	$3,40 \cdot 10^3$	$6,34 \cdot 10^2$	15,98	452,70
	$y = 3,19 \cdot 10^3 x + 7,60 \cdot 10^3$ $R^2 = 0,999$	$y = 4,20 \cdot 10^3 x + 12,9 \cdot 10^4$ $R^2 = 0,998$	$y = 4,65 \cdot 10^3 x + 2,26 \cdot 10^4$ $R^2 = 0,994$				5,14
OPIS	$y = 1,15 \cdot 10^{-2} x + 3,44 \cdot 10^{-2}$ $R^2 = 0,998$	$y = 1,29 \cdot 10^{-2} x + 5,00 \cdot 10^{-3}$ $R^2 = 0,998$	$y = 1,20 \cdot 10^{-2} x + 7,31 \cdot 10^{-2}$ $R^2 = 0,993$				
	$y = 1,21 \cdot 10^{-2} x + 3,35 \cdot 10^{-2}$ $R^2 = 0,998$	$y = 1,16 \cdot 10^{-2} x + 2,05 \cdot 10^{-2}$ $R^2 = 0,997$	$y = 1,21 \cdot 10^{-2} x + 7,24 \cdot 10^{-2}$ $R^2 = 0,994$	$1,21 \cdot 10^{-2}$	$4,23 \cdot 10^{-4}$	3,49	0,74
	$y = 1,21 \cdot 10^{-2} x + 2,88 \cdot 10^{-2}$ $R^2 = 0,999$	$y = 1,25 \cdot 10^{-2} x + 3,83 \cdot 10^{-2}$ $R^2 = 0,998$	$y = 1,22 \cdot 10^{-2} x + 6,74 \cdot 10^{-2}$ $R^2 = 0,993$				

Fonte: Autor.

Quando comparadas 9 replicatas autênticas em três dias diferentes, o CV para os coeficientes angulares das curvas com OPIS (3,49%) apontaram maior congruência entre os resultados do que as curvas sem o tratamento (15,98%). Além disto, a ANOVA fator único indicou valores de $F_{\text{calculado}}$ de 0,74 e 452,70, respectivamente para as curvas com OPIS e sem OPIS. O valor retornado para o $F_{\text{crítico}}$ foi de 5,14, o que indica que as curvas realizadas em dias diferentes utilizando OPIS são consideradas estatisticamente iguais para um nível de 95 % de confiança, visto que $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$.

Uma constatação do método foi a ocorrência de “*carry over*”, ou transferência do analito entre injeções, como é denominado pelo fabricante do autoamostrador, foi experimentado por este método e é visível no primeiro pico da Figura 21 e 22 (aprox. 5,7 minutos), referente a matriz isenta de analito, do qual não deveria exibir sinais para a metformina. Este sinal encontra-se em um nível muito próximo ao LOD. A transferência de analito entre injeções não pode ser completamente suprimida, mesmo após, a limpeza da seringa (interna e externa) entre os procedimentos de injeção.

5.2.1 Magnitude do erro proporcionado por variações no volume de injeção

Em virtude de neste método o padrão interno ser inserido em uma injeção que não a da amostra ou solução padrão, leva a impossibilidade de normalização do erro associado à variação do volume injetado pelo autoamostrador. Para averiguar e possivelmente mensurar esta variação, o LC-MS não pode ser utilizado, pois os processos que ocorrem na fonte de ionização proporcionariam respostas que não indicariam variações para somente o critério estudado. Por este motivo que foi necessário o auxílio do HPLC-UV. O resultado percentual do erro (CV) pode ser verificado em função do volume de injeção pela Tabela 8.

Tabela 8. Medição do erro provocado pela variação no volume de injeções de tolueno realizadas pelo autoamostrador utilizado em todo o trabalho (Condições do método: HPLC-UV com detecção em 255 nm; coluna Agilent Zorbax Eclipse Plus C-18 (4,6 x 150 mm; 5 μ m); MeOH (95%):H₂O como eluente a 1 mL min⁻¹ em modo isocrático na proporção 85:15, número de réplicas = 25).

Volume Injeção (μl)	Média (Área)	Desvio Padrão	CV (%)
0,2	378,4	1,6	0,4
0,5	999,2	3,7	0,4
1,0	2041,3	8,8	0,4
2,0	4072,3	10,5	0,3
5,0	9755,7	14,7	0,2

Fonte: Autor.

Fica evidente na análise dos resultados que independente do volume empregado, o erro associado à injeção é pequeno, um pouco mais pronunciado quanto menor o volume injetado. Inclusive, a propagação deste erro, não ocasionaria problemas significativos na análise quantitativa. Este erro encontrar-se-á embutido no valor da precisão experimental avaliada no tópico a seguir.

5.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MÉRITO

O efeito de matriz foi avaliado por comparação das curvas de calibração externa e por fortificação do extrato da matriz isenta, ambas realizadas de maneira automatizada e normalizadas por OPIS, e pode-se verificar o exposto da Tabela 9.

Das curvas externas foram obtidos coeficientes angulares de $0,0091 \pm 6,10 \cdot 10^{-4}$, enquanto que para as curvas de superposição de matriz $0,0119 \pm 3,46 \cdot 10^{-4}$. Foi observada maior sensibilidade nas curvas que contiveram a matriz, o que indica aumento na ionização do analito, em comparação a sua ionização em soluções padrão. Do teste F ($\alpha = 0,05$) foi observado $F_{\text{calc.}} < F_{\text{crit.}}$ o que indica a homogeneidade entre as variâncias das duas curvas. Logo, foi aplicado o teste t ($\alpha = 0,05$) para variâncias equivalentes que indicou $t_{\text{calc.}} > t_{\text{crit.}}$ Esta resposta infere que a calibração externa e de superposição de matriz não são estatisticamente iguais (BRASIL, 2011). Além da verificação estatística também foi mensurado o quociente dos coeficientes angulares e obteve-

se valor de 1,43, que esta fora da faixa aceitável de 0,9 e 1,1 (HOFF et al, 2015).

Tabela 9. Parâmetros de validação relativos a seletividade e linearidade da calibração automática por superposição de matriz, com padronização interna.

Parâmetros	Metformina
Seletividade	
efeito de matriz - teste $F_{\text{calculado}}$ ^(a)	3,08
efeito de matriz - teste $t_{\text{calculado}}$ ^(b)	6,93
razão dos coeficientes angulares ^(c)	1,31 ± 0,08
Linearidade ^(d)	
faixa de calibração (ng mL ⁻¹)	20,0 - 140,0
coeficiente angular (µl ng ⁻¹)	0,0119 ± 3,46.10 ⁻⁴
coeficiente de determinação (R ²)	0,999
regressão linear - $F_{\text{calculado}}$ ^(e)	7897,8
Limite de detecção (ng mL⁻¹) ^(f)	0,8
Limite de quantificação (ng mL⁻¹) ^(f)	2,1

^(a) $F_{\text{crítico}} = 19$ para a significância de 95% ($\alpha = 0,05$)

^(b) $t_{\text{crítico}} = 2,78$ (bi-caudal) var. equivalentes e significância de 95% ($\alpha = 0,05$)

^(c)Valores aceitáveis entre 0,9 e 1,1

^(d)curva por fortificação de matriz isenta em oito níveis e triplicata (n = 24)

^(e) $F_{\text{crítico}} = 4,301$ para a significância de 95% ($\alpha = 0,05$)

^(f)limites de detecção e quantificação respectivos a S/N 3 e 10, respectivamente

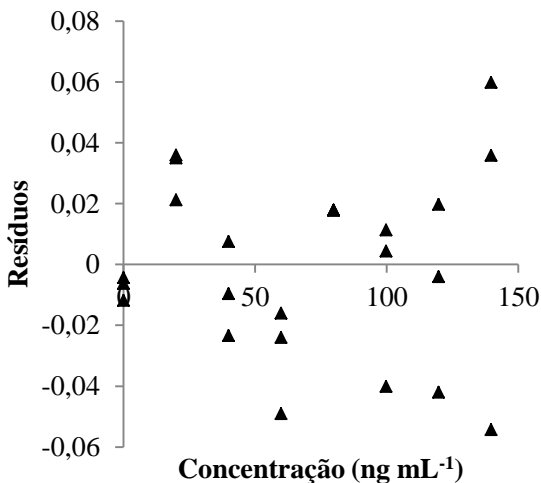
Fonte: Autor

Somente como exemplo, sem a padronização interna, as curvas externas ($1570 \pm 30,22$) quando comparadas as curvas por superposição de matriz ($4102,03 \pm 25,33$) evidenciaram um efeito de matriz muito mais expressivo. Pode-se constatar a partir dos dados estatísticos obtidos: $F_{\text{calculado}} = 3,269$ foi menor que $F_{\text{crítico}} = 161,448$, e o tratamento com teste t para variâncias equivalentes retornou $t_{\text{calculado}} = 88,876$ maior que $t_{\text{crítico}} = 4,303$. E o quociente dos coeficientes angulares demonstrou valor ainda mais discrepante, $2,61 \pm 0,04$ (HOFF et al., 2015).

Quanto à linearidade para a curva de calibração por fortificação de extrato da matriz isenta, o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi maior que $F_{\text{crítico}}$ demonstrando significância da regressão na faixa de 20 – 140 ng mL⁻¹ avaliada (oito níveis de concentração). Proporcionou um coeficiente de

determinação (R^2) de 0,999 e resíduos da regressão (Figura 23) sem perfil tendencioso evidente. Nenhum ponto dos resíduos da regressão foi verificado com o teste de Grubbs. Os valores de LOD e LOQ foram observados pela relação sinal-ruído (S/N) em 3 e 10 em nove determinações, e o valor retornado foi de 0,8 e 2,1 ng mL⁻¹ respectivamente.

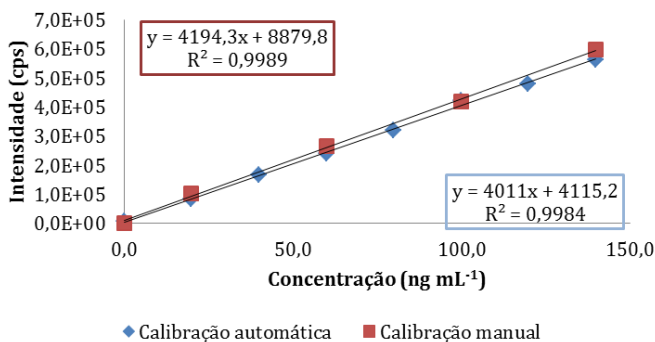
Figura 23. Resíduos da regressão observados para a calibração utilizada no presente trabalho.



Fonte: Autor.

A calibração por fortificação do extrato de matriz isenta foi selecionada para facilitar a quantificação das amostras de plasma de tilápia-do-nilo, ao admitir que as matrizes das amostras são idênticas. Os resultados dos procedimentos de preparação das curvas realizadas manualmente e automatizada foram comparados ($n = 10$) e podem ser visualizados na Figura 24.

Figura 24. Comparação das curvas de calibração por superposição de matriz realizada de maneira manual (quadrado) e automatizada (losango) (n = 10).



A comparação visual evidencia a semelhança dos procedimentos. Assim como o valor da razão dos coeficientes angulares é de 1,04, um desvio inferior a 10% entre os procedimentos.

Os valores observados para as precisões, observados na Tabela 10 foram observados para padrões adicionados a amostra. No caso da precisão instrumental, foi verificada a metformina (80 ng mL⁻¹) em dez injeções consecutivas observadas em apenas um cromatograma, com relação a área e o tempo de retenção. Foram observados, respectivamente, valores melhores que 2,86 e 0,25%. Para a precisão intra-ensaio, que foi avaliada em 20, 80 e 140 ng mL⁻¹ analisados no mesmo dia em replicatas autênticas (n = 9), foram observados valores melhores que 2,68 e 0,22% para a área e o tempo de retenção. Por fim, a precisão intermediária, avaliada em dias diferentes, consistiu na análise da metformina nos mesmos três níveis de concentração replicados (n = 3), retornou valores melhores que 3,28 e 0,23 para o área e o tempo de retenção.

Tabela 10. Valores dos parâmetros de mérito observados para a metformina, em termos das precisões avaliadas com relação ao coeficiente de variação (%).

Parâmetros Avaliados	Metformina
Precisão Instrumental*⁽¹⁾	
área do pico - CV (%)	2,86
tempo de retenção- CV (%)	0,25
Precisão Intra-ensaio*⁽²⁾	
área do pico- CV (%)	0,45 - 2,68
tempo de retenção- CV (%)	0,19 - 0,22
Precisão Intermediária*⁽³⁾	
área do pico- CV (%)	0,73 - 3,28
tempo de retenção- CV (%)	0,06 - 0,23

*Observações do CV calculadas por $CV(\%) = \sigma/\mu$, em que σ é o desvio padrão amostral e μ a média aritmética da série de dados, tanto para a área dos picos quanto para o tempo de retenção da metformina.

⁽¹⁾determinado pelo CV (n = 10) em um único nível de conc.

⁽²⁾determinado pelo CV (n = 9) em três níveis de conc. analisados no mesmo dia.

⁽³⁾determinado pelo CV (n = 9) em três níveis de conc. analisados em dias diferentes.

Fonte: Autor.

A última etapa avaliada para a validação foi a recuperação, com o intuito de fazer inferência a exatidão e seletividade do método. Realizada em três níveis de concentração (15, 22,5 e 44,9 ng mL⁻¹) e em triplicata, adicionados ao plasma de tilápia-do-nilo em etapa de precipitação proteica (diluídos em acetonitrila). O procedimento recupera entre 94,2 e 99,8% para a metformina, como pode ser verificado na Tabela 11.

Tabela 11. Valores observados a partir do ensaio de recuperação para a adição de metformina ao plasma de tilápia-do-nilo.

Concentração adicionada (ng ml ⁻¹) ^(a)	Concentração obtida (ng ml ⁻¹) ^(b)	Recuperação (%) ^(c)
15,0	14,8 ± 1,1	98,9
22,5	22,4 ± 0,8	99,8
44,9	42,3 ± 0,3	94,2

^(a)adições realizadas ao plasma em triplicata para cada nível de concentração adicionado (n = 9).

^(b)quantificação a partir da curva de calibração por superposição de matriz realizada em triplicata, com 8 níveis de conc.

^(c)Razão das médias das observações obtidas, sobre as concentrações adicionadas, em base percentual (%).

Fonte: Autor.

5.4 AMOSTRAS DE PLASMA DE TILÁPIA-DO-NILO

Assim como especificado, as amostras apresentavam-se enquadradas em grupos distintos, de acordo com a suplementação de metformina e dieta de carboidrato das quais os indivíduos foram submetidos. Os valores quantificados para cada uma das amostras estão listados na Tabela 12.

Para o plasma codificado como M2, M3, M5, M6, M9, M12, M14 e M16 o método não indicou sinais respectivos a metformina. Enquanto que, para as amostras M1, M4, M7, M8, M10, M11, M13 e M15 foi possível avaliar o teor de metformina. Não houve variação nos tempos de retenção para as amostras, em relação à análise de padrões. Os resultados da quantificação estão expressos em µg de metformina por mL de plasma.

Tabela 12. Valor encontrados para metformina em 10^3 ng mL⁻¹ nas amostras de plasma de tilápia-do-nilo.

Código da amostra de plasma de Tilápia-do-Nilo	Concentração Metformina (10^3 x ng ml⁻¹)*
M1^{nc}	2,35 ± 0,14
M2^c	< LOD
M3^c	< LOD
M4^{nc}	1,29 ± 0,11
M5^c	< LOD
M6^c	< LOD
M7^{nc}	3,30 ± 0,26
M8^{nc}	0,59 ± 0,00
M9^c	< LOD
M10^{nc}	1,21 ± 0,31
M11^{nc}	1,12 ± 0,17
M12^c	< LOD
M13^{nc}	1,00 ± 0,01
M14^c	< LOD
M15^{nc}	4,10 ± 0,07
M16^c	< LOD

* valores de metformina em ng por ml de plasma (* 10^3)

nc = não controle

c = controle

Fonte: Autor.

5.5 DESTAQUES DO MÉTODO PROPOSTO

Além de comprovada a possibilidade de normalização com o padrão interno sendo o próprio analito, houve como consequência o aumento na repetitividade do método. Aliada a praticidade no preparo das curvas, o método ainda possibilita ao usuário/operador, a utilização

de apenas três recipientes presentes no rack do autoamostrador (solvente, solução padrão estoque e extrato amostral) para a realização de réplicas em diversos níveis de concentração, tanto de curvas externas quanto de curvas que utilizam da matriz para efeitos de compensação (vide Figura 25).

Figura 25. Rack do autoamostrador contendo recipientes referentes (a) curvas de calibração por fortificação do extrato de matriz isenta do compartimento e (b) recipientes contendo o extrato matricial, solução padrão e solvente. Com três recipientes (b) é possível realizar inúmeras réplicas autênticas de curvas de calibração com diversos níveis de concentração com pequenas alíquotas misturadas na seringa do autoamostrador, por comandos básicos do software.



Este procedimento destaca-se para casos em que se disponha de pouca amostra, visto que, pouco volume do extrato amostral é necessária para a injeção, de maneira a requisitar, volumes bastante inferiores aos métodos convencionais, o que promove maior usabilidade e praticidade no preparo. Outro destaque é o menor contato do usuário/operador com o preparo, o que pode acarretar em erros mais previsíveis, baseados somente na precisão do injetor.

6 CONCLUSÃO

O método espectrométrico desenvolvido para o monitoramento da metformina concordou com os métodos MRM reportados na literatura. A FRULIC-N necessitou de 50% a mais de volume de fase móvel no pré-condicionamento, quando necessária a alteração de proporções de seus constituintes, quando comparada a colunas mais bem estabelecidas.

Com as condições cromatográficas otimizadas o método propiciou perfil que se enquadra no que é estabelecido como conformidade cromatográfica satisfatória.

O erro associado ao autoamostrador pode ser desconsiderado quando comparado ao montante total de variações instrumentais. MISER, OPIS e APEA puderam ser implementadas com fácil programação do autoamostrador e, a partir desta combinação foi alcançada repetitividade estatisticamente comprovada para curvas realizadas em dias diferentes com OPIS, a padronização interna com o próprio analito.

O método apresentou-se 3,7 vezes mais rápido e econômico do que as injeções convencionais. O método com finalidade quantitativa HILIC-MS/MS foi desenvolvido, validado e aplicado com sucesso para determinação de metformina em fase estacionária de ciclofrutano-6 nativo e em amostras de plasma de tilápia-do-nilo.

Ficam destacadas a diminuição da interferência

REFERÊNCIAS

ANTIGNAC, JP. et al. The ion suppression phenomenon in liquid chromatography–mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 529, n. 1, p. 129-136, 2005.

ALPERT, Andrew J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. **Journal of chromatography A**, v. 499, p. 177-196, 1990.

ALPERT, Andrew J. HILIC at 21: Reflections and perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 35, p. 5879, 2011.

ARAYNE, M. S.; SULTANA, N.; TABASSUM, A. RP-LC simultaneous quantitation of co-administered drugs for (non-insulin dependent) diabetic mellitus induced dyslipidemia in active pharmaceutical ingredient, pharmaceutical formulations and human serum with UV-detector. **Clinica Chimica Acta**, v. 425, p. 54-61, 2013.

ARGAUD, D.; et al. Metformin decreases gluconeogenesis by enhancing the pyruvate kinase flux in isolated rat hepatocytes. **European Journal of Biochemistry**, v. 213, n. 3, p. 1341-1348, 1993.

BAILEY, C. J.; DAY, C. Metformin: its botanical background. **Practical Diabetes International**, v. 21, n. 3, p. 115-117, 2004.

BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; MEURER, F. Digestibilidade aparente da energia e nutrientes de alimentos convencionais e alternativos para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). **Rev. Bras. Zootec.**, v. 31, n. 2, p. 539-545, 2002.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**. 72 p, 2011

BRIONES, R. M.; SARMAH, A. K.; PADHYE, L. P. A global perspective on the use, occurrence, fate and effects of anti-diabetic drug metformin in natural and engineered ecosystems. **Environmental Pollution**, v. 219, p. 1007-1020, 2016.

BUSZEWSKI, B.; NOGA, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 402, n. 1, p. 231-247, 2012.

CASS, Q. B.; BARREIRO, J. C. Os avanços tecnológicos na química analítica: sucessos e desafios. **Cienc. Cult.**, v. 63, n. 1, Jan. 2011.

CHHETRI, H. P.; THAPA, P.; VAN SCHEPDAEL, A. Simple HPLC-UV method for the quantification of metformin in human plasma with one step protein precipitation. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 22, n. 5, p. 483-487, 2014.

CHO, K.; et al. Antihyperglycemic mechanism of metformin occurs via the AMPK/LXR /POMC pathway. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

COLE, R. **Electrospray ionization mass spectrometry: fundamentals, instrumentation, and applications**. Wiley-Interscience, 1997.

DA SILVA, A. M. **Metformina no desempenho e composição corporal de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) alimentada com duas concentrações de carboidratos**. Dissertação de mestrado. Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, 2015

EL-SAYED, A.-F. M. **Tilapia culture**. CABI, Capítulo 6, p. 106-107, 2006.

GOSETTI, F. et al. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 25, p. 3929-3937, 2010.

HERTZ, Y., et al. Effects of metformin on plasma insulin, glucose metabolism and protein synthesis in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture**. 1989;80:175–187.

HEMRE, G.-I.; MOMMSEN, T. P.; KROGDAHL, Å. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 175-194, 2002.

HEMSTROM, P. et al. Controlling Selectivity on Zwitterionic HILIC Columns by Adjusting pH and Buffer Strength. **Chromatography Today**, v. 3, p. 7, 2013.

HERNÁNDEZ, B. et al. Protonation–deprotonation and structural dynamics of antidiabetic drug metformin. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 114, p. 42-48, 2015.

HOFF, R. B. et al. Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis. **Talanta**, v. 132, p. 443-450, 2015.

KIM, Y. D. et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase–dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP. **Diabetes**, v. 57, n. 2, p. 306-314, 2008.

KOSMA, C. I.; LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Comprehensive study of the antidiabetic drug metformin and its transformation product guanylurea in Greek wastewaters. **Water research**, v. 70, p. 436-448, 2015.

KRUVE, A. et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. **Analytica chimica acta**, v. 870, p. 29-44, 2015.

KOT-WASIK, A.; JAKIMSKA, A.; ŚLIWKA-KASZYŃSKA, M. Occurrence and seasonal variations of 25 pharmaceutical residues in wastewater and drinking water treatment plants. **Environmental monitoring and assessment**, v. 188, n. 12, p. 661, 2016.

LANÇAS, F. M. Cromatografia Líquida com Interação Hidrofílica (HILIC). **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 49-57, 2010.

LIU, A.; COLEMAN, S. P. Determination of metformin in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 29, p. 3695-3700, 2009.

LOUGH, W. J.; WAINER, I. W. (Ed.). **High performance liquid chromatography: fundamental principles and practice**. CRC Press, 1995.

MAJIDANO, S. A.; KHUHAWAR, M. Y. GC Determination of Famotidine, Ranitidine, Cimetidine, and Metformin in Pharmaceutical Preparations and Serum Using Methylglyoxal as Derivatizing Reagent. **Chromatographia**, v. 75, n. 21-22, p. 1311-1317, 2012.

MADIRAJU, A. K. et al. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. **Nature**, v. 510, n. 7506, p. 542, 2014.

MICHEL, D. et al. Development and validation of fast and simple flow injection analysis–tandem mass spectrometry (FIA–MS/MS) for the determination of metformin in dog serum. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 107, p. 229-235, 2015.

MISTRI, H. N.; JANGID, A. G.; SHRIVASTAV, P. S. Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of antidiabetic drugs metformin and glyburide in human plasma. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 45, n. 1, p. 97-106, 2007.

MOHAMED, A-M. I. et al. An efficient hydrophilic interaction liquid chromatographic method for the simultaneous determination of metformin and pioglitazone using high-purity silica column. **Journal of Chromatography B**, v. 997, p. 16-22, 2015.

MOON, Thomas W. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction?. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 129, n. 2, p. 243-249, 2001.

MOWAKA, Shereen et al. Enhanced LC-MS/MS determination of alogliptin and metformin in plasma: Application to a pharmacokinetic study. **Microchemical Journal**, v. 130, p. 360-365, 2017.

NANITA, S. C.; KALDON, L. G. Emerging flow injection mass spectrometry methods for high-throughput quantitative analysis. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 408, n. 1, p. 23-33, 2016.

NIEMUTH, N. J.; KLAPER, R. D. Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish. **Chemosphere**, v. 135, p. 38-45, 2015.

OOSTERHUIS, M.; SACHER, F.; TER LAAK, T. L. Prediction of concentration levels of metformin and other high consumption pharmaceuticals in wastewater and regional surface water based on sales data. **Science of The Total Environment**, v. 442, p. 380-388, 2013.

PANSERAT, S. et al. Metformin improves postprandial glucose homeostasis in rainbow trout fed dietary carbohydrates: a link with the induction of hepatic lipogenic capacities?. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 297, n. 3, p. R707-R715, 2009.

PADIVITAGE, N. L. T.; ARMSTRONG, D. W. Sulfonated cyclofructan 6 based stationary phase for hydrophilic interaction chromatography. **Journal of separation science**, v. 34, n. 14, p. 1636-1647, 2011.

POLAKOF, S.; SKIBA-CASSY, S.; PANSERAT, S. Glucose homeostasis is impaired by a paradoxical interaction between metformin and insulin in carnivorous rainbow trout. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 297, n. 6, p. R1769-R1776, 2009.

POLAKOF, S.; PANSERAT, S. How Tom Moon's research highlighted the question of glucose tolerance in carnivorous fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 2015.

PONTAROLO, R. et al. Simultaneous determination of metformin and vildagliptin in human plasma by a HILIC-MS/MS method. **Journal of Chromatography B**, v. 965, p. 133-141, 2014.

POLSON, C. et al. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 785, n. 2, p. 263-275, 2003.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

ROGERS, C. A. et al. An alternative approach for assessment of liquid chromatography-mass spectrometry matrix effects using auto-sampler

programmed co-injection. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 408, n. 8, p. 2009-2017, 2016.

SAINI, N. et al. Intravaginal administration of metformin hydrochloride loaded cationic niosomes amalgamated with thermosensitive gel for the treatment of polycystic ovary syndrome: In vitro and in vivo studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 144, p. 161-169, 2016.

SCHALLER, J. et al., **Blood Components, in Human Blood Plasma Proteins: Structure and Function**, John Wiley & Sons, cap. 3, p. 17-20, 2008

SCHERF-CLAVEL, M.; HÖGGER, P. Analysis of metformin, sitagliptin and creatinine in human dried blood spots. **Journal of Chromatography B**, v. 997, p. 218-228, 2015.

SCHEURER, M. et al. Occurrence and fate of the antidiabetic drug metformin and its metabolite guanylurea in the environment and during drinking water treatment. **Water research**, v. 46, n. 15, p. 4790-4802, 2012.

AB SCIEX, **Manual optimization tutorial**. AB SCIEX, 2011.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of chromatography A**, v. 987, n. 1, p. 57-66, 2003.

SHU, Y. et al. Separation of therapeutic peptides with cyclofructan and glycopeptide based columns in hydrophilic interaction liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1390, p. 50-61, 2015.

SIEGLE, Alexander F.; TRAPP, Oliver. Implementation of Hadamard encoding for rapid multisample analysis in liquid chromatography. **Journal of separation science**, v. 38, n. 22, p. 3839-3844, 2015.

SILVA, C. G. A.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. Cromatografia por interação hidrofílica (HILIC): Estado da arte e aplicações. **Quím. Nova**, v. 39, n. 2, p. 210-220, 2016.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentos de química analítica**. Reverté, ed. 8, cap. 32, p. 925-933, 1997.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. John Wiley & Sons, 2011.

SONG, J-Z. et al. Determination of metformin in plasma by capillary electrophoresis using field-amplified sample stacking technique. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 708, n. 1, p. 277-283, 1998.

SOŚNICKI, S.; KAPRAL, Małgorzata; WĘGLARZ, Ludmiła. Molecular targets of metformin antitumor action. **Pharmacological Reports**, 2016.

STANIFORTH, Michael; STAVROS, Vasilios G. Recent advances in experimental techniques to probe fast excited-state dynamics in biological molecules in the gas phase: dynamics in nucleotides, amino acids and beyond. In: **Proc. R. Soc. A.**, 2013.

TALLURI, M. K; KALYANKAR, A.; RAGAMPETA, S. Synchronized separation of atorvastatin—an antihyperlipidemic drug with antihypertensive, antidiabetic, antithrombotic drugs by RP-LC for determination in combined formulations. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 4, p. 285-292, 2012.

TANG, D-Q. et al. HILIC-MS for metabolomics: An attractive and complementary approach to RPLC-MS. **Mass Spectrom Rev**, v. 10, 2014.

TAYLOR, Paul J. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. **Clinical biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 328-334, 2005.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. **Metformin Hydrochloride Extended- Release Tablets**. Revision Bulletin, Disponível em:

<http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/metforminHydrochlorideERTablets.pdf>. Acesso em: 06 Ago 2016.

TŪMA, Petr. Large volume sample stacking for rapid and sensitive determination of antidiabetic drug metformin in human urine and serum by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1345, p. 207-211, 2014.

UÇAKTŪRK, E. The development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of metformin in human plasma. **Analytical Methods**, v. 5, n. 18, p. 4723-4730, 2013.

VAN EECKHAUT, Ann et al. Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: evaluation of matrix effects. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 23, p. 2198-2207, 2009.

VASUDEVAN, M. et al. ION-pair liquid chromatography technique for the estimation of metformin in its multicomponent dosage forms. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 25, n. 1, p. 77-84, 2001.

VICENTE, I. S. T.; ELIAS, F.; FONSECA-ALVES, C. E.. Perspectivas da produçāo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Rev. de Ciēncias Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 392-398, 2014.

VISTUBA, J. P. et al. Increasing the instrumental throughput of gas chromatography method using multiple injections in a single experimental run: Application in determination of friedelan-3-ol and friedelin in *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Chromatography A**, v. 1274, p. 159-164, 2013.

VITALI, L. et al. Using multiple short-end injections to develop fast electrophoretic separations—applications in iodide analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 28, p. 4586-4591, 2011.

XIONG, X.; LIU, Y.. Chromatographic behavior of 12 polar pteridines in hydrophilic interaction chromatography using five different HILIC columns coupled with tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 150, p. 493-502, 2016.

WELCH, C. J. et al. MISER chromatography (multiple injections in a single experimental run): the chromatogram is the graph. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 21, n. 13, p. 1674-1681, 2010.

WELCH, C. J. et al. MISER LC-MS analysis of teas, soft drinks and energy drinks. **LCGC North Am**, v. 33, n. 4, p. 262-269, 2015.

WILSON, R. P. Utilization of dietary carbohydrate by fish. **Aquaculture**, v. 124, n. 1, p. 67-80, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global report on diabetes**.

Disponível em:

<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf>. Acessado em: 27 Nov. 2016.

WU, X. et al. Optimization of a solid phase extraction and hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of metformin in dietary supplements and herbal medicines. **Food chemistry**, v. 133, n. 2, p. 482-488, 2012.

WULFFELÉ, MG et al. The effect of metformin on blood pressure, plasma cholesterol and triglycerides in type 2 diabetes mellitus: a systematic review. **Journal of internal medicine**, v. 256, n. 1, p. 1-14, 2004.

ZHANG, Wei et al. Determination of metformin in rat plasma by HILIC-MS/MS combined with Tecan automation and direct injection. **Biomedical Chromatography**, v. 26, n. 10, p. 1163-1169, 2012.

ZARGHI, A. et al. Rapid determination of metformin in human plasma using ion-pair HPLC. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 31, n. 1, p. 197-200, 2003.

ZNALEZIONA, J. et al. Determination of rosiglitazone and metformin in human serum by CE-ESI-MS. **Journal of separation science**, v. 34, n. 10, p. 1167-1173, 2011.