

Vítor Debatin Vieira

NOVAS ESTRATÉGIAS DE QUANTIFICAÇÃO E
PADRONIZAÇÃO INTERNA UTILIZANDO INJEÇÕES
MÚLTIPLAS EM LC-ESI-MS/MS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke

Florianópolis
2016

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

Vieira, Vitor Debatin

Novas estratégias de quantificação e padronização interna
utilizando injeções múltiplas em LC-ESI-MS/MS / Vitor
Debatin Vieira ; orientador, Gustavo Amadeu Micke -
Florianópolis, SC, 2016.

91 p.

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

Inclui referências

1. Química. 2. injeções múltiplas. 3. frequência
analítica. 4. cromatografia líquida. 5. padrão interno em
plugue externo. I. Micke, Gustavo Amadeu. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Química. III. Título.

Agradecimentos

A Deus, que me concedeu oportunidades além das minhas expectativas e saúde e forças para aproveitá-las.

Aos meus pais, Joarez e Marilene, que puderam me proporcionar uma educação de qualidade em toda minha vida de estudante, sempre me incentivando a continuar em frente.

À minha esposa e “parceirinha” Camila que, **pacientemente**, aguentou minhas malcriações e ajudou em todo meu percurso como mestrando. Valeu, gata!

À minha família por todo o apoio e compreensão. Lucas e Patrick, meus irmãos, Nilzo e Mirtes, meus super sogros, Tia Marisa, querendo ajudar a todo custo e Vó Dolores, sempre incomodada com minhas incomodações. Vocês são demais!

Aos meus dindos, Tio Neto e Tia Cris, que me deram o empurrão para iniciar o mestrado. Se não fosse por vocês este trabalho não existiria (e eu não seria mestre)!

Aos meus amigos do LabEC, Diogo, Victor, Samantha, Maira e Liza, por todo suporte e risadas.

Ao meu orientador, professor Gustavo, sempre muito prestativo e solícito. Ser seu aluno é um privilégio enorme. Obrigado por tudo!

Ao laboratório de controle de qualidade JR Hidroquímica, por me conceder uma bolsa de estudos durante o período do meu mestrado.

À UFSC e ao Programa de Pós-graduação em química pela oportunidade e pelo ensino público e de Qualidade.

Resumo

Os propósitos deste estudo foram a aplicação da técnica de injeções múltiplas para a construção e comparação entre curvas analíticas e introdução de uma nova variação de padronização interna: *o padrão interno em plugue externo* (OPIS), que é o próprio analito sequencialmente injetado em um plugue externo à amostra. Para os estudos com injeções múltiplas foi desenvolvido um método isocrático para determinação de cloridrato de clindamicina, eritromicina estolato e azitromicina em formulações farmacêuticas por LC-ESI-MS/MS. Foram estatisticamente comparadas 60 curvas analíticas pertencentes a cinco diferentes estratégias de calibração: calibração externa simples, calibração externa por MISER (*Multiple Injection in a Single Experimental Run*), calibração externa simples com OPIS, e calibração externa por MISER com OPIS. Como resultados, a cromatografia MISER possibilitou a construção de curvas de calibração confiáveis em menos de cinco minutos, triplicando a frequência analítica e reduzindo consumo de solventes e geração de resíduos frente ao método convencional de calibração. Além disso, a técnica de injeções múltiplas demonstrou-se valiosa em permitir a adição do OPIS em substituição aos padrões internos clássicos para correção de erros espectrais.

Palavras chave: cromatografia líquida, espectrometria de massas, injeções múltiplas, MISER, padrão interno, frequência analítica, padrão interno em plugue externo.

Abstract

The goal of this study was the application of the multiple injections technique for calibration curves elaboration and the introduction of a brand-new type of internal standardization: the Outer Plug Internal Standard (OPIS), which is the very analyte sequentially injected in an external plug. For the multiple injections studies an isocratic LC-ESI-MS/MS method for determining clindamycin hydrochloride, erythromycin estolate and azithromycin in pharmaceuticals was developed. Statistical comparison was applied to 48 calibration curves belonging to four different calibration strategies: simple external calibration, MISER (Multiple Injection in a Single Experimental Run) external calibration, simple external calibration with OPIS, and MISER external calibration with OPIS. As results, MISER chromatography has turned possible the construction of trustworthy calibration curves in less than five minutes, tripling the analytical throughput and reducing solvent consumption and waste production opposite the conventional calibration method. Besides, the multiple injections technique proved to be valuable in allowing the addition of OPIS in replacement to classic internal standardization to correct spectral errors.

Keywords: liquid chromatography, mass spectrometry, multiple injections in a single experimental run, MISER, internal standard, analytical throughput, outer plug internal standard.

Lista de Figuras

- Figura 1:** Ilustração da interdisciplinaridade da química analítica. 25
- Figura 2:** Esquema de um sistema HPLC. 28
- Figura 3:** Ilustração dos diferentes métodos de construção de curva de calibração. 31
- Figura 4:** Duas injeções distintas representadas em um mesmo eletroferograma na determinação de propranolol (a) e nitrato e tiocianato com correção do volume de amostra (b). 35
- Figura 5:** Cromatogramas multiplexados completos (a, b) e uma seção modular de seus respectivos cromatogramas Hadamard-transformados (c, d). 36
- Figura 6:** Misergrama da análise de cafeína em diferentes bebidas. 37
- Figura 7:** Estrutura molecular da a) azitromicina, b) clindamicina e c) eritromicina. 38
- Figura 8:** Ilustração do método analítico para quantificação da dose de antibióticos pelo método microbiológico por difusão em disco. ... 41
- Figura 9:** Conformação das amostras em placas para 54 *vials* no HPLC Agilent 1200 Series. 48
- Figura 10:** Cromatogramas da azitromicina (superior), eritromicina (centro) e clindamicina (inferior) em coluna ZORBAX Eclipse XDB-C₈ (150 mm x 2,1 mm x 3,5 μm), fase móvel 80% solvente A e 20% de solvente B; fluxo 200 μL.min⁻¹. 55
- Figura 11:** Cromatogramas da azitromicina (superior), eritromicina (centro) e clindamicina (inferior) em coluna Poroshell 120 EC-C₁₈ (50 mm x 4,6 mm x 2,7 μm), fase móvel 80% solvente A e 20% de solvente B; fluxo 200 μL.min⁻¹. 56
- Figura 12:** Cromatogramas da azitromicina (superior), eritromicina (centro) e clindamicina (inferior) em coluna Synergi Polar-RP

Phenyl (150 mm x 2 mm x 4 μm), fase móvel 80% solvente A e 20% de solvente B; fluxo 400 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ **58**

Figura 13: Cromatograma da clindamicina a 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em coluna Synergi Polar-RP (150 mm x 2 mm x 4 μm), fase móvel 80% solvente A e 20% de solvente B; fluxo 400 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ **59**

Figura 14: Misergramas de uma curva de calibração externa simples adicionada do OPIS por uma injeção adicional nas condições cromatográficas adotadas. Todos os picos são referentes a padrões de clindamicina nas concentrações A) 2 e 6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, B) 4 e 6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, C) 6 e 6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, D) 8 e 6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e E) 10 e 6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente **61**

Figura 15: Misergrama de uma curva de calibração externa em MISER, sem OPIS, com cinco pontos nas condições cromatográficas adotadas. Todos os picos são referentes a padrões de clindamicina nas concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente. **62**

Figura 16: Misergrama de uma curva de calibração externa em MISER com uso do OPIS com cinco pontos nas condições cromatográficas adotadas. Todos os picos são referentes a padrões de clindamicina nas concentrações de 2, 4, 6, 6, 8 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente. . **63**

Figura 17: Curvas de calibração externas simples médias diárias **66**

Figura 18: Curvas de calibração externas em MISER médias diárias. **69**

Figura 19: Curvas de calibração externas simples com OPIS inserido por injeções múltiplas médias diárias **74**

Figura 20: Curvas de calibração externas em MISER com OPIS médias diárias **76**

Lista de Tabelas

Tabela 1: Propriedades dos analitos.....	38
Tabela 2: Comparativo entre condições de análise cromatográficas para determinação de azitromicina, clindamicina e eritromicina em formulações farmacêuticas conforme monografias da farmacopéia americana.	39
Tabela 3: Rotina programada para construção de uma curva de calibração de 5 pontos em MISER com o amostrador automático.	49
Tabela 4: Rotina programada para construção de uma curva de calibração de 5 pontos mais <i>padrão interno em plugue externo</i> em MISER com o amostrador automático.	50
Tabela 5: Rotina programada para construção das curvas de calibração externas simples com <i>padrão interno em plugue externo</i> por injeções múltiplas.	50
Tabela 6: Energias e potenciais otimizados para análise em MRM de clindamicina, azitromicina e eritromicina.	54
Tabela 7: Íon precursor, íon produto 1 e íon produto 2 em MRM da clindamicina, eritromicina e azitromicina.	55
Tabela 8: Coeficiente de determinação, coeficiente angular e coeficiente linear de cada curva de calibração externa simples construída ao longo de 4 dias aleatoriamente escolhidos.	65
Tabela 9: Resultados dos testes de recuperação das curvas de calibração externas simples.	67
Tabela 10: Coeficiente de determinação, coeficiente angular e coeficiente linear de cada curva de calibração externa construída por MISER ao longo de 4 dias aleatoriamente escolhidos.	68
Tabela 11: Resultados dos testes de recuperação das curvas de calibração externas em MISER.	69

Tabela 12: Resultados do teste-t aplicado às curvas analíticas externa simples (Variável 1) e em MISER (Variável 2) com um intervalo de 95% de confiança e admitindo-se variâncias iguais.	71
Tabela 13: Área média (n=5), desvio padrão e desvio padrão relativo do módulo amostrador automático do HPLC Agilent 1200 Series em cinco volumes de injeção.	72
Tabela 14: Coeficiente de determinação, coeficiente angular e coeficiente linear de cada curva de calibração externa simples construída com uso de OPIS por injeções múltiplas ao longo de 4 dias aleatoriamente escolhidos.	73
Tabela 15: Resultados dos testes de recuperação das curvas de calibração externas simples com OPIS por injeções múltiplas.	75
Tabela 16: Coeficiente de determinação, coeficiente angular e coeficiente linear de cada curva de calibração externa com OPIS em MISER construída com injeções múltiplas ao longo de 4 dias aleatoriamente escolhidos.	75
Tabela 17: Resultados dos testes de recuperação das curvas analíticas externas em MISER com OPIS.	77
Tabela 18: Resultados do teste-t aplicado às curvas externa simples com OPIS inserido por injeções múltiplas (Variável 1) e curva externa com OPIS em MISER (Variável 2) com um intervalo de 95% de confiança e admitindo-se variâncias iguais.	77
Tabela 19: Resultados do teste-t aplicado às curvas externa simples com OPIS inserido por injeções múltiplas (Variável 1) e curva externa com OPIS em MISER (Variável 2) com um intervalo de 95% de confiança e admitindo-se variâncias iguais.	78
Tabela 20: Comparativo entre as recuperações no ponto 6 ppm para as curvas médias diárias.	79
Tabela 21: Resultados dos testes de recuperação das curvas analíticas externas em MISER com o ponto 6 ppm de cada curva de calibração adotado como OPIS.	80

Tabela 22: Resultados dos testes de recuperação das curvas analíticas externas em MISER com o ponto 6 ppm de cada curva de calibração adotado como OPIS. **80**

Tabela 22: Tempo total de análise necessário para construção das 12 curvas analíticas por cada uma das estratégias apresentadas. **82**

Abreviaturas

ACN – Acetonitrila.

AcNH₄ – Acetato de Amônio.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

CE – Energia de Colisão (do inglês, *Collision Energy*).

CEP – Potencial de Entrada da Cella de Colisão (do inglês, *Cell Entrance Potential*).

cP – Centipoise.

CSA – Ácido Canforsulfônico (do inglês, *Camphorsulfonic Acid*).

CXP – Potencial de Saída da Cella de Colisão (do inglês, *Cell Exit Potential*).

DAD – Detector de Arranjo de Diodos.

DP – Potencial de Desagregação (do inglês, *Declustering Potential*).

EP – Potencial de Entrada (do inglês, *Entrance Potential*).

ESI – Ionização por Eletrospray (do inglês, *Electrospray Ionization*).

GC-FID – Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização em Chama (do inglês, *Gas Chromatography Flame Ionization Detection*).

HCOOH – Ácido Fórmico.

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*).

HTA – Análises de Alto Rendimento (do inglês, *High Throughput Analysis*).

HTE – Experimentos de Alto Rendimento (do inglês, *High Throughput Experimentation*).

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia.

LC – Cromatografia Líquida (do inglês, *Liquid Chromatography*).

LOD – Limite de Detecção.

LOQ – Limite de Quantificação.

MISER – Injeções Múltiplas em Corrida Experimental (do inglês, *Multiple Injection Single Experimental Run*).

MCA – Aquisição de Canais Múltiplos (do inglês, *Multiple Channel Acquisition*).

MeOH – Metanol.

MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas.

MS – Espectrometria de Massas (do inglês, *Mass Spectrometry*).

OPIS – Padrão interno em plugue externo (do inglês, *Outer plug Internal Standard*).

pH – Potencial Hidrogeniônico.

PO₄ – Fosfato.

Q1 – Primeiro Quadrupolo.

Q3 – Terceiro Quadrupolo.

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada.

RSD – Desvio padrão relativo (do inglês, *Relative Standard Deviation*).

SIL – Isótopo estável (do inglês, *Stable Isotopically Labeled*).

SFC – Cromatografia de fluido supercrítico (do inglês, *Supercritical Fluid Chromatography*).

USP – Farmacopéia Norte Americana (do inglês *U.S. Pharmacopeia*).

Sumário

1. Justificativa.....	23
2. Revisão da Literatura.....	25
2.1 Química analítica e os métodos de separação.....	25
2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência e técnicas de calibração.....	28
2.2.1 Padronização interna em LC-MS.....	32
2.3 Injeções múltiplas em cromatografia e eletroforese capilar.....	33
2.4 Aplicação e analitos.....	37
3. Objetivos.....	43
3.1 Objetivo geral.....	43
3.2 Objetivos específicos.....	43
4. Procedimento Experimental.....	45
4.1 Reagentes e soluções.....	45
4.2 Instrumentação.....	45
4.3 Condições cromatográficas.....	46
4.4 Padrões e curvas de calibração.....	47
4.5 Amostrador automático.....	48
5. Resultados e discussões.....	53
5.1 Caracterização e ionização dos analitos no MS.....	53
5.2 Desenvolvimento do método cromatográfico.....	55
6. Conclusões.....	85
7. Referências.....	87

1. Justificativa

Cada vez mais a pesquisa acadêmica e os protocolos de controle de qualidade urgem por métodos analíticos mais rápidos, simples, baratos e ambientalmente amigáveis. Neste sentido, com a evolução da instrumentação analítica, novas possibilidades são abertas com cada inovação.

Mesmo assim, apesar de as técnicas instrumentais e de preparo de amostras hoje disponíveis permitirem a determinação de praticamente qualquer componente em uma ampla variedade de matrizes, muitas vezes o fator limitante da viabilidade de um método consiste ou no uso de grandes quantidades de solventes orgânicos, ou procedimentos laboriosos, ou ainda em materiais e produtos custosos e/ou de difícil obtenção. Como exemplos podemos citar, respectivamente, preparos de amostras por métodos clássicos como extração líquido-líquido ou Soxhlet, longas corridas cromatográficas e padrões internos deuterados. Infelizmente, muitas vezes, estas são características intrínsecas de métodos oficiais ou de normas já consagradas e que dificilmente sofrem atualizações.

Um destes métodos, presente em diversas farmacopéias ao redor do mundo, consiste na análise de doseamento e uniformidade de conteúdo de medicamentos antibióticos pela técnica do halo de inibição microbiológico, necessitando de 15 horas ou mais para obtenção do resultado – categorizando características indesejáveis para sua aplicação no controle de qualidade da indústria farmacêutica. Além disso, mesmo para métodos cromatográficos oficiais, a própria etapa de calibração pode ser uma etapa laboriosa, principalmente quando se trata da implantação de novo método e, portanto, passível de validação.

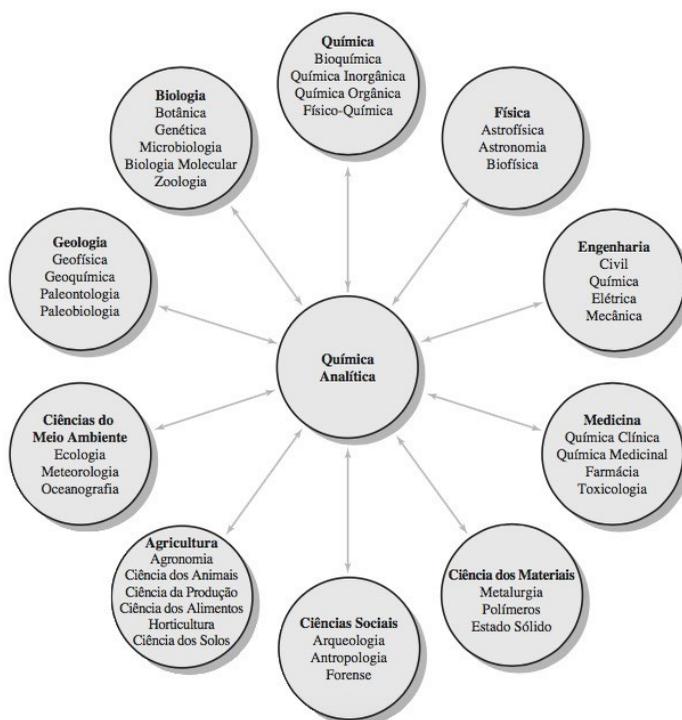
Com a finalidade de reduzir o tempo total de análise, elevar a frequência analítica, diminuir o consumo de solventes orgânicos e eliminar a necessidade por padrões internos caros e de difícil obtenção é proposto um método cromatográfico em LC-ESI-MS/MS que viabiliza a adoção da técnica de injeções múltiplas para a construção de curvas analíticas, e posterior determinação em formulações, de três antibióticos adotando o próprio analito como uma nova técnica de padronização interna.

2. Revisão da Literatura

2.1 Química analítica e os métodos de separação

A química analítica é uma ciência de medição que consiste em um conjunto de ideias e métodos que são úteis em todos os campos da ciência, medicina e indústria (SKOOG, 2009). Embora esta seja uma definição um pouco ampla, a química analítica é, em sua essência, uma ciência interdisciplinar de importância e abrangência centrais, como ilustra a Figura 1.

Figura 1: Ilustração da interdisciplinaridade da química analítica.



Fonte: Skoog, 2009.

Na prática, a química analítica proporciona métodos para determinação qualitativa e quantitativa de elementos e substâncias em

materiais diversos, podendo ir desde a análise de metais em água para consumo humano até análise de esteroides anabolizantes em urina para exame antidoping. Enquanto uma análise qualitativa nos informa sobre a identidade das espécies em uma amostra, os métodos quantitativos possibilitam a atribuição de um valor numérico indicativo da quantidade de cada uma dessas espécies.

A química analítica pode ser dividida em duas grandes categorias: os métodos clássicos e os instrumentais. No princípio do desenvolvimento da química analítica a maioria das análises empregavam a separação dos analitos por técnicas clássicas como precipitação, extração ou destilação. Em análises qualitativas, os componentes separados eram tratados com reagentes de modo a se obter produtos que seriam identificados por sua cor, ponto de ebulição, ponto de fusão, solubilidade em uma série de solventes, seu odor, atividade ótica ou índice de refração. Já os meios quantitativos clássicos se resumem a medições volumétricas ou gravimétricas (SKOOG, 2007). Contudo, embora fundamentais mesmo para os dias atuais, estes métodos sempre foram muito laboriosos e dispendiosos de tempo e mão-de-obra, sendo gradualmente substituídos pelos métodos instrumentais.

O primeiro método de análise instrumental, desenvolvido por Robert Bunsen e Gustav Kirchhoff em 1860, era fundamentado na espectroscopia de absorção atômica de chama (ARIKAWA, 2001). Deste momento em diante os químicos começaram a utilizar de novos fenômenos, como condutância, diferença de potencial, absorção e emissão de luz, relação massa/carga de moléculas e fluorescência, para a detecção e quantificação de espécies químicas com maior seletividade.

Em uma sociedade industrializada os químicos analíticos passaram a desempenhar um papel ainda mais importante, não somente no desenvolvimento de novos métodos analíticos, como também no controle de qualidade das matérias-primas e produtos acabados. Além disso, os processos industriais, em sua maioria, despejam efluentes contendo poluentes que podem ser preocupantes para a saúde humana e bem-estar da sociedade e meio ambiente. Nestes casos deve-se proceder com análises quantitativas não somente do ar, água e solo contaminados como também dos efluentes, a fim de propor tratamentos ou ações mitigadoras que garantam que os contaminantes emitidos permaneçam dentro dos padrões de qualidade.

Infelizmente, nem todas as fontes poluidoras são estacionárias e fáceis de serem identificadas e monitoradas como as industriais. Um exemplo atual desta problemática foi descrito por Peng (2016), onde é apresentada a ocorrência de drogas abusivas (como cocaína,

metanfetaminas, morfina, codeína, diazepam, tetrahydrocannabinol) e seus metabólitos em água potável ao longo da Europa, Ásia e América na ordem de ng.L^{-1} . Embora estes níveis traço não sejam capazes de induzir efeitos tóxicos agudos em humanos, a maior preocupação está na bioacumulação a longo prazo, dada a lipofilicidade de muitos destes fármacos e drogas de abuso.

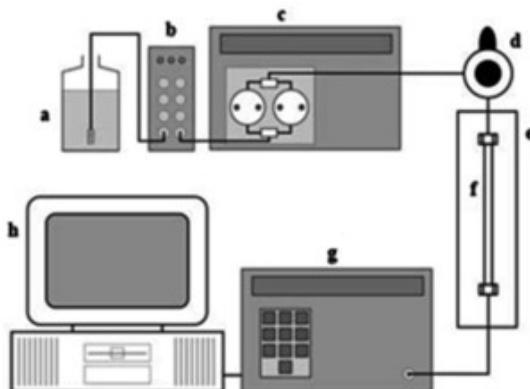
É evidente que estudos como este só puderam ser realizados a partir do aprimoramento das técnicas de detecção. Apesar de ainda muito utilizados (e muitas vezes até preferidos) em todos os ramos de aplicação, os detectores mais convencionais como ultravioleta ou fluorescência, na cromatografia líquida, e ionização em chama ou captura de elétrons, em cromatografia gasosa, têm sido substituídos pela espectrometria de massas devido à sua versatilidade analítica. Enquanto a cromatografia gasosa permanece atada à análise de compostos voláteis/volatilizáveis (ou derivatizáveis à tais), a cromatografia líquida abrange as moléculas termolábeis. A necessidade de abordagem destas moléculas e de detectar quantidades cada vez menores dos analitos levou desenvolvimento e aperfeiçoamento da configuração LC-MS (do inglês, *liquid chromatography tandem mass spectrometry*), que teve seu limite de detecção instrumental melhorado em aproximadamente 10.000 vezes nos últimos 30 anos (BARCELÓ, 2007).

Além das necessidades ambientais e forenses por detectores mais sensíveis e seletivos surge a demanda industrial por produtividade e controle de qualidade em grande escala. Como exemplo, a partir dos anos 1980 a indústria farmacêutica nacional deparou-se com dois cenários críticos: o aumento no grau de exigência na concessão de novos medicamentos por parte da ANVISA e o crescimento relâmpago na venda de medicamentos genéricos que passou de 2 milhões para 5 milhões de unidades ao mês, em média, no ano de 2001, demandando métodos analíticos mais rigorosos e uma elevada frequência analítica em controle de qualidade.

2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência e técnicas de calibração

Ainda no início do século XX, a descoberta da cromatografia (TSWETT, 1903) e da eletroforese (TISELIUS, 1930) possibilitou a separação de misturas complexas, como componentes de extratos de plantas, e a quantificação dos compostos de interesse. Os diversos métodos de separação cromatográfica têm sido aplicados para decifrar os inúmeros e complexos problemas da química, bioquímica, ciências ambientais, toxicologia, etc., tanto no nível acadêmico como comercialmente (COLLINS, 2006). Em cromatografia, seja ela líquida, gasosa, permeação em gel, camada delgada, fluido supercrítico, ou qualquer uma das outras modalidades, uma solução da amostra é injetada no cromatógrafo e os compostos constituintes da mistura são cromatograficamente separados por suas diferentes interações com uma fase estacionária enquanto são progressivamente eluídos por uma fase móvel. A Figura 2 esquematiza um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, onde a amostra é injetada em *d* e eluída através de uma coluna contendo a fase estacionária em *f* por uma fase móvel *a* sendo bombeada por *c*. Os componentes separados pela cromatografia são detectados em *g* e os dados são adquiridos no computador *h*.

Figura 2: Esquema de um sistema HPLC.



Mas a identificação e quantificação, de forma cada vez mais sensível e seletiva, de uma variedade tão grande de substâncias só foi possível em virtude do avanço na instrumentação da área de separações. Como exemplos temos a determinação de compostos orgânicos voláteis e pesticidas por cromatografia gasosa (GALCERAM, 2002; SRIDHARA, 2012) e de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos por cromatografia líquida de alta eficiência (DAWES, 1997).

Para que se possa realizar uma análise química quantitativa, ou seja, determinar a quantidade de um dado composto presente em uma amostra, é imprescindível a etapa de calibração. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), conforme abordado na Resolução RDC nº 134, o termo *calibração* é definido como um “conjunto de operações que estabelecem, sob condições especificadas, a relação entre os valores indicados por um instrumento de medida, sistema, ou valores apresentados por um material de medida, comparados àqueles obtidos com um padrão de referência correspondente”.

Para análises eletroforéticas e cromatográficas existem diferentes estratégias de calibração que atendem à definição da ANVISA. A *relação* mencionada na definição é normalmente realizada pela associação de uma quantidade conhecida do analito ao respectivo sinal fornecido pelo detector. Como sinal, normalmente é utilizada a área do pico cromatográfico e, menos usualmente, sua altura (USP 29, <621>). Dentre as estratégias clássicas de calibração em cromatografia estão: padronização externa, superposição de matriz e adição de analito. Uma curva de calibração constitui em uma regressão linear (Equação 1) da concentração do padrão, no eixo das abcissas, por sua resposta relativa, eixo das ordenadas (BARROS, 2002). Na equação, *a* é o coeficiente angular enquanto *b* é o coeficiente linear; aos termos *y* e *x* são associadas a resposta e a quantidade de analito, respectivamente.

$$y = a \cdot x + b \qquad \text{Equação 1}$$

Embora apenas dois pontos sejam o suficiente para definir uma reta, uma curva de calibração não deve ser definida por menos do que cinco pontos que não incluam o zero da curva, por motivo dos devidos erros associados (THOMPSON, 2002).

O método da padronização externa consiste na comparação da área do analito em uma amostra com a equação de regressão linear da curva de calibração construída a partir da medição de soluções do padrão, preparadas em um solvente de trabalho, em diferentes concentrações. Este método, no entanto, é suscetível a interferentes provindos da matriz, erros

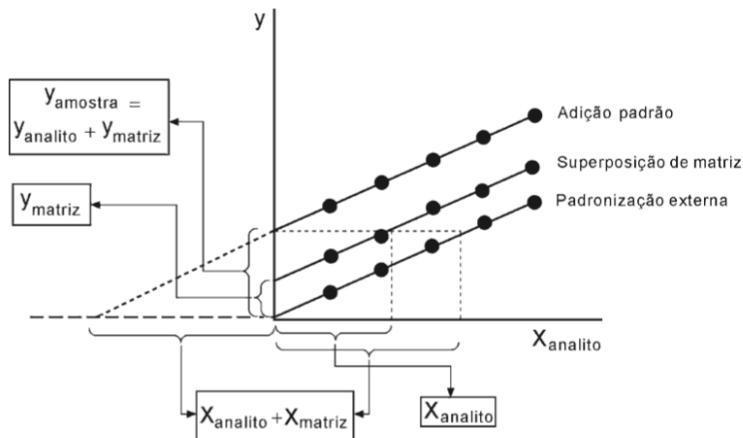
de preparo da amostra e dos padrões e de injeção e, neste caso, inferindo na necessidade do preparo de uma nova curva a cada análise. Em todo caso, devido a sua simplicidade, este método pode ser utilizado se o analista possui pleno conhecimento das condições experimentais e de contribuição de interferência por parte da matriz da amostra (CUADROS-RODRÍGUEZ, 2001).

Para correção das interferências matriciais foi proposta calibração por superposição de matriz (do inglês, *matrix-matched calibration*), ou curva na matriz. Como sugere o nome, nesta técnica, diferentemente da calibração externa onde os padrões são preparados em um solvente de trabalho, a curva é preparada a partir de uma matriz similar à amostra e isenta dos analitos, sendo então fortificada com o composto de interesse. Posteriormente, os resultados são igualmente submetidos à regressão linear para plotagem da curva de calibração. Apesar de ser um método confiável, a dificuldade em encontrar uma matriz isenta dos analitos, ou material de referência, é um inconveniente principalmente para análises de rotina; isto leva diretamente ao segundo problema que é a diferença de intensidade desses efeitos e à concentração de interferentes na matriz, que podem diferir de uma amostra para outra (CUADROS-RODRIGUEZ, 2003). Por exemplo, por mais que se consiga uma matriz de plasma sanguíneo isenta dos analitos, a amostra de plasma do paciente A pode conter muito mais interferentes do que o plasma do paciente B.

Para estes casos onde tanto a padronização externa quanto a superposição de matriz são inviáveis, recomenda-se a calibração por adição de analito, ou adição de padrão. Nesta abordagem alíquotas da própria amostra são submetidas a adições conhecidas do analito. Na sequência, plota-se a curva de calibração e extrapola-se a reta para o segundo quadrante do eixo cartesiano, onde $y = 0$. Neste ponto, o eixo das abscissas define a concentração de analito na amostra original (BERG, 1988). Apesar de trabalhoso e, muitas vezes, até mesmo inviável, principalmente para laboratórios de rotina, o método da adição de padrão é especialmente importante quando a amostra é demasiadamente complexa, quando as interações com a matriz são significativas ou quando houver dificuldade em se encontrar uma matriz isenta dos analitos (SNYDER, 1997).

A Figura 3, a seguir, ilustra os três tipos de curvas analíticas até então mencionadas.

Figura 3: Ilustração dos diferentes métodos de construção de curva de calibração.



Fonte: Ribani, 2004.

Independentemente do método de calibração empregado, para que uma curva de calibração seja considerada confiável é imprescindível que seja avaliada sua linearidade, ou seja, sua capacidade em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito (ICH, 1995; USP 24, <1225>). Para tal, utiliza-se o coeficiente de correlação r (CHUI, 2002); quanto mais próximo de 1,0 o valor de r , menor a dispersão do conjunto de pontos e menores os erros associados aos coeficientes linear e angular calculados a partir da regressão linear da reta. Para verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa podem ser efetuados os testes de ajuste do modelo linear, validade da regressão, eficiência e eficiência máxima (BARROS, 2001). A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,99 enquanto, o INMETRO (2007), valor superior a 0,90.

Também é comum que o analista escolha uma faixa de aplicação, com não menos que cinco pontos, compreendendo mínimos e máximos (valores inferior e superior da reta, respectivamente) dentro de uma faixa linear. A faixa linear indica o intervalo dos pontos que responde linearmente à faixa de aplicação corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior da substância em exame, que atenda aos requisitos de precisão e exatidão (SWARTZ, 1998). Embora seja feita de modo empírico por muitos analistas, várias recomendações podem ser

encontradas na literatura. Como exemplo, ANVISA (2003) especifica um intervalo que compreenda entre 80% e 120% do valor nominal para fármacos.

Independentemente da técnica de quantificação adotada, método final selecionado deve fornecer a melhor exatidão possível e um alto nível de precisão. A metodologia escolhida para quantificação deve atingir estes objetivos em um menor tempo possível, com um mínimo de envolvimento do operador, além de utilizar pouca quantidade de amostra (RIBANI, 2004). Em adição, as atuais tendências da Química Verde sugerem métodos mais rápidos e com baixos consumo de solvente e geração de resíduos.

2.2.1 Padronização interna em LC-MS

Para todos os três tipos de calibração anteriormente mencionados pode-se implementar o uso de um padrão interno. Esta variação implica na adição da substância escolhida como padrão interno em todas as soluções dos padrões, amostras e extratos das amostras sempre em mesma concentração. A curva será então plotada com a razão das áreas do analito e do padrão interno no eixo das ordenadas. Este método é especialmente útil por independe de pequenas mudanças em variáveis experimentais, como variações espectrais e volume de injeção. Entretanto, com a introdução da espectrometria de massas à cromatografia líquida para análises quantitativas, o propósito do padrão interno foi voltado principalmente para correção de erros de detecção (WIELING, 2002).

Apesar de apresentar sensibilidade e seletividade inigualáveis, a detecção por espectrometria de massas apresenta uma desvantagem inerente. Quando um composto deixa a coluna e é introduzido na fonte de ionização apenas parte do número total de moléculas é ionizado; esta eficiência de ionização depende amplamente da estrutura química do composto, mas, adicionalmente, pode variar em operações *interday* como resultado de alguns parâmetros que, apesar de otimizáveis, são de difícil (ou quase impossível) controle, como a temperatura e a pressão da fonte de ionização (STOKVIS, 2005). Portanto, a padronização interna é considerada essencial em ensaios quantitativos empregando detecção por espectrometria de massas, dado que essas variações afetam somente as respostas absolutas, e não a razão das respostas (JOHNSTONE, 1996).

Idealmente, a substância usada como padrão interno deve ter tempo de retenção próximo ao analito, ser inerte a todos os componentes da matriz, não fazer parte da amostra, apresentar boa resolução

cromatográfica e ser estruturalmente similar ao analito (KRULL, 1998).

Em espectrometria de massas há ainda outro fator que contribui para o aumento de erros. Quando o analito é introduzido na fonte ele deverá competir por ionização juntamente com outros compostos presentes na matriz; infelizmente o grau de supressão depende diretamente de sua estrutura, o que significa que, caso o padrão interno não seja suficientemente similar ao analito, ambos podem sofrer diferentes graus de supressão iônica (STOKVIS, 2005). Por este motivo análises quantitativas em LC-MS utilizam padrões internos que sejam ou estruturalmente similares ao analito ou isótopos estáveis (SIL, do inglês, *Stable Isotopically Labeled*). Os SIL são padrões internos onde 3 – 8 átomos de ^1H , ^{12}C , ^{14}N ou ^{16}O são substituídos por seus isótopos de massa imediatamente superior, sendo os isótopos de carbono e os deuterados os mais comuns. Em contrapartida, além de serem muito custosos, de difícil obtenção, ou até mesmo indisponíveis, os padrões internos isotópicos podem apresentar propriedades físico-químicas levemente diferentes, podendo levar a diferenças cromatográficas (KATO, 2000; STOKVIS, 2005; WIELING, 2002).

2.3 Injeções múltiplas em cromatografia e eletroforese capilar

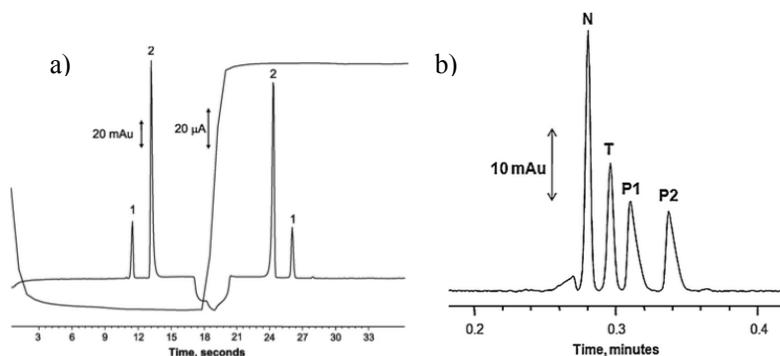
Viu-se, nos últimos anos, um aumento na necessidade por experimentos de alto rendimento (HTE, do inglês, *High Throughput Experimentation*) na descoberta, investigação e otimização de reações orgânicas (CYPES, 2009; RAJAN, 2008; WEBSTER, 2008). Estas técnicas experimentais, possíveis devido aos avanços na automação, são apreciados por ambos nichos acadêmico e industrial. Enquanto o HTE continua a expandir há uma constância na necessidade pelas técnicas de análise de alto desempenho (HTA, do inglês, *High Throughput Analysis*), que possibilitem aos analistas a manter o ritmo no tratamento de dados experimentais (WANG, 2009).

Apesar dos consideráveis avanços, como programação do *software* para auto-integração de picos cromatográficos, é comum aos pesquisadores investir a maior fração do tempo de análise no tratamento dos dados analíticos (WELCH, 2010). Em cromatografia, uma rotina comumente encontrada consiste na alocação das amostras em *vials* seguida da injeção da amostra e corrida cromatográfica, obtenção dos cromatogramas individuais de cada amostra, integração das áreas dos

picos através da ferramenta de trabalho do *software* do equipamento e exportação dos dados para um software de planilhas, onde os valores são utilizados para construção da curva de calibração e posterior cálculo dos teores dos analitos nas amostras. Apesar de os *softwares* mais modernos possibilitarem uma integração intuitiva (ou até mesmo automática) de todas estas etapas, nota-se que, em alguns casos, a rotina de integração pode ser um pouco inflexível e demandar algum tempo do analista para ajustá-la à sua necessidade; enquanto as ferramentas de tratamento de dados não sofrem as atualizações necessárias para satisfazer as necessidades analíticas e com a finalidade de minimizar estas etapas e o tempo de tratamento de dados, novas técnicas de HTA vêm sendo propostas.

Na abordagem de aumento da frequência analítica, Micke *et al.* (2009) propôs modificações operacionais para redução do tempo total de análise (TAT, do inglês, *Total Analysis Time*) na determinação de propranolol por eletroforese capilar. Ainda em eletroforese capilar, foi proposto um método para quantificação de nitrato e tiocianato em saliva com coleta por *swab* e correção do volume de amostra por comparação entre os picos do padrão interno injetados em duas situações: antes e após a coleta; a visualização dos analitos e do padrão interno em duas situações P1 (antes) e P2 (depois) fica representada em um único eletroferograma, como apresentado na Figura 4 (VITALI, 2011a).

Figura 4: Duas injeções distintas representadas em um mesmo eletroferograma na determinação de propranolol (a) e nitrato e tiocianato com correção do volume de amostra (b).

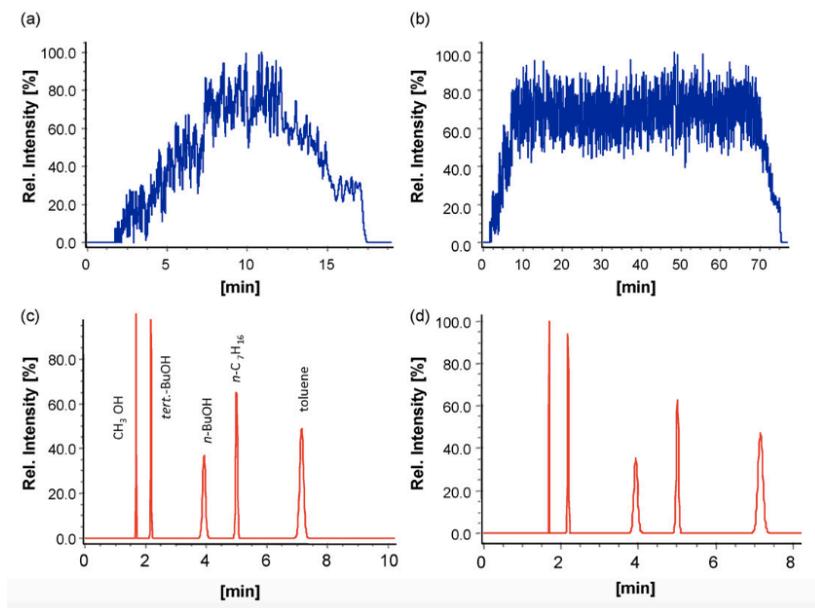


Fonte: Vitali, 2009 (a) e 2011a (b).

Também em 2011 foi proposta a determinação de iodeto por injeções múltiplas em eletroforese capilar; o método possibilitou a análise simultânea de quatro amostras corrigidas por padrão interno (VITALI, 2011b).

Outra variável da técnica de injeções múltipla é de cromatografia multiplexada com decodificação Hadamard; esta técnica utiliza injeções pseudo-aleatórias derivadas de matrizes Hadamard, possibilitando injeções sequenciais rápidas que fornecem um cromatograma multiplexado contendo os picos de uma série de amostras com analitos similares. O cromatograma convencional é obtido pela aplicação da transformada de Hadamard; variações na transformada dos cromatogramas multiplexados ainda permitem a obtenção de cromatogramas individuais de cada amostra injetada. Tem-se aplicações da técnica em cromatografia gasosa (TRAPP, 2010), líquida (SIEGLE, 2014) e de permeação em gel (SIEGLE, 2016). A Figura 5 traz um exemplo visual.

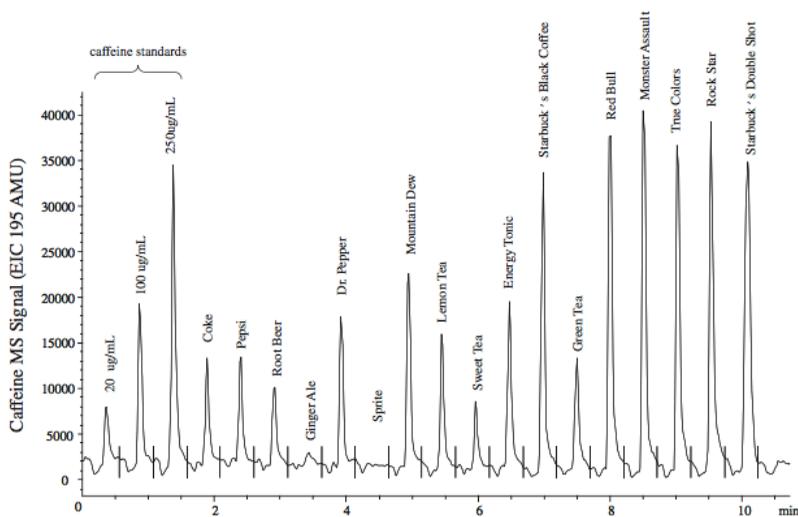
Figura 5: Cromatogramas multiplexados completos (a, b) e uma seção modular de seus respectivos cromatogramas Hadamard-transformados (c, d).



Fonte: Siegle, 2016.

Em cromatografia, Welch (2010) propôs pela primeira vez o termo *MISER Chromatography* (*Multiple Injections in a Single Experimental Run*) na sondagem da concentração de cafeína em diferentes bebidas por HPLC. O método consiste na injeção de três soluções de cafeína, a 20 – 100 – 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, seguida da injeção das amostras; a quantificação foi feita por comparação de picos. Para evitar que os picos de cafeína de diferentes injeções coeluem, calcula-se o tempo necessário de espaçamento entre as injeções; logo, em MISER, os picos pertencentes a um mesmo analito são separados temporalmente ao invés de cromatograficamente. Para a representação gráfica desta análise o autor nomeou-a misergrama, originalmente *misergram* em inglês, conforme apresentado na Figura 6.

Figura 6: Misergrama da análise de cafeína em diferentes bebidas.



Fonte: Welch, 2010.

Há três anos a técnica de injeções múltiplas foi aplicada à cromatografia gasosa (MISER GC-FID), possibilitando a determinação de friedelan e friedelan-3-ol em extratos de plantas; a técnica foi capaz de aumentar em 2,6 vezes a frequência analítica em relação ao método convencional por injeções simples (VISTUBA, 2013).

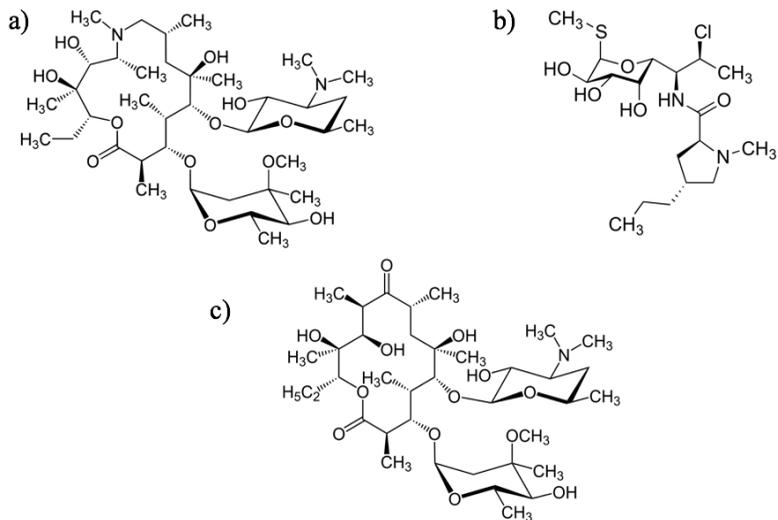
Em 2016 foi publicado o primeiro trabalho de injeções múltiplas

em cromatografia de fluido supercrítico (MISER SFC) para análise de pureza enantiomérica (ZAWATZKY, 2016); o método possibilitou a análise de 96 amostras em 34 minutos.

2.4 Aplicação e analitos

A indústria farmacêutica encontra-se sob constante pressão para acelerar a descoberta de novos medicamentos, impulsionar a produtividade e quantificar rapidamente uma crescente variedade de fármacos (PAPP, 2013). Por este motivo, esforços têm sido empenhados nas etapas de automatização, miniaturização e alto rendimento das análises (CHEN, 2003).

Além disso, tratando de controle de qualidade, os métodos propostos nas monografias farmacopéicas demandam de instrumentação de alto grau de especificidade em função do medicamento de interesse para análise, inferindo ou na necessidade por cromatógrafos dedicados ou em tempo improdutivo de troca das condições analíticas, como coluna, fase móvel e/ou detector. Como exemplo temos os métodos da farmacopeia americana (USP, do inglês, *United States Pharmacopeia*) para determinação de clindamicina, eritromicina e azitromicina (Figura 7 e Tabela 1) em matéria-prima farmacêutica e em cápsulas com diferentes condições cromatográficas, conforme apresentado na Tabela 2.

Figura 7: Estrutura molecular da a) azitromicina, b) clindamicina e c) eritromicina.**Tabela 1:** Propriedades dos analitos

Analito	Peso molecular (g/mol)	Log K_{ow}	pK _a
Azitromicina	748,996	4,02	8,74
Clindamicina	424,981	2,16	7,79
Eritromicina	733,937	3,06	8,88

Fonte: PubChem

Tabela 2: Comparativo entre condições de análise cromatográficas para determinação de azitromicina, clindamicina e eritromicina em formulações farmacêuticas conforme monografias da farmacopéia americana.

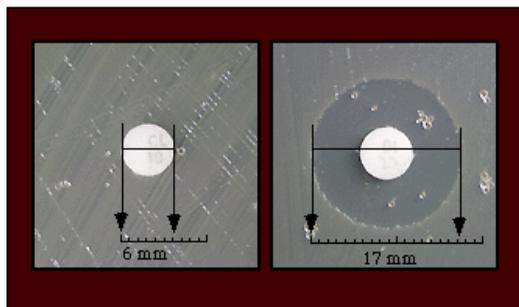
Analito	Fonte	Método	Condições analíticas
Azitromicina	USP	HPLC-PAD	Coluna: L49, 15 cm. FM: 1,5 1 mL.min ⁻¹ KH ₂ PO ₄ /ACN, pH 11
Azitromicina	FB	Halo de inibição microbiológico	Diluição: tampão PO ₄ pH 8 estéril Placa: 20 mL ágar antibiótico / 5 mL de ágar contaminado <i>Kokuria rhizophila</i> (ATCC 9341). Amostra: 200 µL. Incubação: 35,5 °C por 16-18 h.
Clindamicina (matéria-prima)	USP	HPLC-UV	Coluna: L1, 25 cm. FM: 1 mL.min ⁻¹ 55% tampão PO ₄ , pH 7,5; 45% acetoneitrila. Injeção: 10 µL.
Clindamicina (cápsulas)	USP	HPLC-IR	Coluna: L1, 30 cm. FM: 1 mL.min ⁻¹ CSA/AcNH ₄ /MeOH pH 6,0. Injeção: 25 µL.
Eritromicina (cápsulas)	USP/FB	Halo de inibição microbiológico	Diluição: tampão PO ₄ pH 8 estéril Placa: 20 mL ágar antibiótico / 5 mL de ágar contaminado <i>Kokuria rhizophila</i> (ATCC 9341). Amostra: 200 µL. Incubação: 35,5 °C por 16-18 h.
Eritromicina (matéria-prima)	USP	HPLC-UV	Coluna: L21, 25 cm, 65 °C. FM: 2 mL.min ⁻¹ 62% K ₂ HPO ₄ pH 9,0/ACN/H ₂ O/ <i>t</i> -BuOH; 25% ACN; 13% H ₂ O. Injeção: 100 µL.

Enquanto a análise da matéria-prima é realizada pela injeção de 10 μL e eluição através de uma coluna C_{18} (ou L1, conforme farmacopéias) de 25 cm de comprimento, com fase móvel composta de 55% tampão fosfato pH 7,5 e 45% acetonitrila e utilizando de detecção por ultravioleta (210 nm), a formulação encapsulada é analisada pela injeção de 25 μL em uma coluna de 30 cm contendo mesma fase estacionária, detecção por índice de refração e uma fase móvel complexa preparada contendo ácido *dl*-10-canforsulfônico (CSA), acetato de amônio, metanol e pH final ajustado para 6.

A eritromicina é outro exemplo de divergência metodológica entre formulações farmacêuticas. Enquanto algumas delas, como a matéria-prima, utiliza da cromatografia líquida de alta eficiência (detector UV, coluna L21 (copolímero de estireno-divinilbenzeno) a 65 °C, 100 μL de injeção), outras, como eritromicina encapsulada, utilizam de ensaio microbiológico por halo de inibição. Este método, além de especialmente trabalhoso e demorado pela necessidade de espera pelo aumento do halo de inibição microbiológico sobre um microorganismo de referência através da incubação das placas em temperatura controlada por 24 horas, requer também uma elevada quantidade de materiais e tempo de preparo, já que as análises de uniformidade de conteúdo devem ser feitas em triplicata, com uma população amostral de 10 cápsulas, totalizando o preparo de 30 placas microbiológicas (ANVISA, Farmacopéia Brasileira).

Um terceiro exemplo são os métodos oficiais para a determinação de azitromicina. Enquanto a USP utiliza uma configuração em cromatografia líquida (dada por detecção amperométrica, coluna de gama-alumina – L29, injeção de 50 μL e uma fase móvel constituída de uma mistura de acetonitrila e fosfato de sódio monobásico ajustada a pH 11), a Farmacopéia Brasileira, assim como em sua própria versão para a eritromicina, emprega o ensaio por difusão em disco. A Figura 7 ilustra este mecanismo.

Figura 8: Ilustração do método analítico para quantificação da dose de antibióticos pelo método microbiológico por difusão em disco.



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention.

Para o caso de medicamentos encapsulados, o conteúdo interno deve ser devidamente removido, dissolvido, diluído e filtrado; na sequência, a solução da amostra é derramada na placa em forma circular com o auxílio de um cilindro metálico esterilizado. Enquanto o halo de inibição pode requerer até 18 h para a leitura, os métodos farmacopéicos cromatográficos apresentados na Tabela 2 não mencionam o tempo de retenção dos analitos.

Nestes exemplos fica ilustrada a necessidade, não somente da simplificação e unificação das condições analíticas intra-formulações como também, sempre que possível, o desenvolvimento de métodos multi-analitos e mais rápidos, visando reduzir o tempo total de análise e, conseqüentemente, aumentar a frequência analítica.

Em 2015, Jank *et al* propuseram um método para determinação de antibióticos do grupo dos macrolídeos (incluindo azitromicina e eritromicina) e das lincosamidas (incluindo a clindamicina) em leite e músculo por LC-ESI-MS/MS; no entanto, os tempos de retenção obtidos, iguais a 6,94 minutos para a azitromicina, 7,10 minutos para a clindamicina e 7,42 para a eritromicina, foram alcançados através de eluição por gradiente de solventes, sendo este um fator impeditivo para o uso da técnica de injeções múltiplas para o aumento da frequência analítica – conforme mencionado adiante.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Estudar a viabilidade do aumento da frequência analítica pela utilização de injeções múltiplas em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para construção de curvas de calibração propondo uma nova variável de padronização interna.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um método cromatográfico para a construção de uma curva de calibração com injeções múltiplas (MISER);
- Propor uma nova variação de padronização interna por injeções múltiplas para correções espectrais;
- Comparar estatisticamente as curvas de calibração construídas;
- Apresentar as principais fontes de erros corrigidas pela calibração por padronização interna;
- Desenvolver uma metodologia analítica de LC-ESI-MS/MS em modo isocrático para a determinação de clindamicina, azitromicina e eritromicina.

4. Procedimento Experimental

4.1 Reagentes e soluções

Os padrões analíticos de cloridrato de clindamicina, eritromicina estolato e azitromicina dihidratada, o tolueno e o ácido fórmico, utilizado como aditivo de fase móvel, foram adquiridos na Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil).

Dos solventes utilizados para preparo dos padrões e fase móvel, a água ultrapurificada foi produzida em um Milli-Q Deionizer (Millipore, Bedford, MA, USA) e acetonitrila grau HPLC adquirida na Tedia Brazil (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O metanol utilizado no preparo das soluções padrão foi igualmente adquirido na Tedia Brazil.

4.2 Instrumentação

O sistema LC-ESI-MS/MS utilizado consiste por um cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) equipado com bomba quaternária, degaseificador de fase móvel, amostrador automático com controle de temperatura com capacidade para 2 bandejas de 54 amostras e compartimento termostaticado para coluna e detector de arranjo de diodos (DAD). A detecção foi realizada em um espectrômetro de massas triploquadrupolar API 3200TM Applied Biosystems/MDS Sciex (Sciex, Concord, Canadá) equipado com cela de colisão LINAC®, fonte de ionização Turbo VTM operando em modo TurboIonSpray® (eletrospray), gerador de gases PEAK Generator (PEAK Scientific Instruments, Renfrew, Escócia) e bomba de infusão Harvard Apparatus (Holliston, MA, EUA). As etapas de desenvolvimento do método, aquisição de dados e tratamento dos cromatogramas foi realizada no *software* Analyst versão 1.6.2.

O espectrômetro de massas foi calibrado em ambos os modos de ionização, positivo e negativo, com uma solução padrão de calibração do próprio fabricante, infundida a 10,0 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ com o capilar posicionado em relação ao contra-eletrodo nas posições 5 e 10 mm nas direções horizontal e vertical, respectivamente. Ar sintético foi utilizado como gás nebulizante (GS1), gás secante (GS2) e gás de exaustão (Exhaust Gas) na fonte Turbo VTM. Nitrogênio foi empregado como cortina de gás de dessolvatação (Curtain GasTM) e como gás de colisão (CAD GasTM) na célula LINAC®.

Os parâmetros potencial de orifício (DP), energia de colisão (CE) e potencial de saída da cela (CXP) do triploquadropolo foram otimizados com padrões dos três compostos de interesse, clindamicina, eritromicina e azitromicina, em modo Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM, do inglês, *Multiple Reactions Monitoring*).

4.3 Condições cromatográficas

Foi desenvolvido um método isocrático em LC-ESI-MS/MS capaz de separar os três analitos. As corridas cromatográficas foram desempenhadas em colunas Synergi Polar-RP Phenyl de 150 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro com tamanho de partícula igual a 4 μm (Phenomenex, Torrance, CA, EUA), ZORBAX Eclipse Plus C₈ (150 mm x 5 mm x 4,6 μm) e Poroshell 120 EC-C₁₈ (50 mm x 4,6 mm x 2,7 μm) (Agilent Technologies) à temperatura de 30 °C.

A eluição foi dada em modo isocrático com fase móvel constituída de 80% de acetonitrila (ACN) e 20% de solução aquosa de ácido fórmico (HCOOH) a 0,1% a um fluxo igual a 400 μL por minuto.

A etapa de injeção utilizou de uma seringa de 100 μL acoplada ao amostrador automático. As condições de injeção fixadas foram o volume de injeção, em 1 μL , e as velocidades de sucção e ejeção, ambas iguais a 200 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

A detecção dos analitos foi realizada em eletrospray no modo de ionização positivo com a otimização dos principais parâmetros da fonte de ionização e cela de colisão conforme: tensão do capilar, 5500 V; temperatura da fonte, 450 °C; gás de nebulização, 45 psi; gás de secagem, 45 psi; gás de colisão, alto; cortina de gás de dessolvatação, 10 psi.

Os experimentos referentes à precisão do injetor automático foram conduzidos em uma coluna ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (150 mm x 5 mm x 4,6 μm) em modo isocrático a 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ com fase móvel composta por 85% de água e 15% de MeOH:H₂O em proporção 95:5. A detecção foi feita a 255 nm no detector de arranjo de diodos.

4.4 Padrões e curvas de calibração

As soluções de infusão no espectrômetro de massas foram preparadas pela diluição das soluções estoque em solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%.

As soluções padrão estoque a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dos três compostos de interesse foram preparadas por sua pesagem e posterior dissolução em metanol grau HPLC. As soluções estoque foram armazenadas sob refrigeração à $-5 \text{ }^\circ\text{C}$.

As soluções de trabalho dos três analitos foram preparadas pelas diluições, em balão volumétrico, de alíquotas das soluções estoque em água ultrapura, fornecendo as concentrações de clindamicina a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, eritromicina a $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e azitromicina a $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. De modo análogo preparou-se uma solução de trabalho mista dos três analitos na mesma concentração mencionada.

A partir de diluições por partes da solução de trabalho de clindamicina às concentrações de 2, 4, 6 e $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram realizados experimentos de construção e comparação entre curvas de calibração. Adotou-se, portanto, a faixa de trabalho de 2 a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo posteriormente apresentados os cálculos dos limites de quantificação e detecção de cada curva de calibração.

Foram elaborados, desenvolvidos e comparados quatro tipos de curvas de calibração: curva de calibração externa simples; curva de calibração externa simples com *padrão interno em plugue externo* (OPIS, do inglês, *Outer Plug Internal Standard*); curva de calibração externa em MISER; curva de calibração externa em MISER com OPIS. O termo OPIS está sendo proposto pela primeira vez neste trabalho e será discutido mais adiante; até que seja devidamente abordado cabe interpretá-lo como um padrão interno convencional. Na calibração simples a curva de calibração é feita de modo convencional, com um ponto por cromatograma; na calibração simples com OPIS cada cromatograma é constituído de um pico da curva de calibração mais um pico do OPIS, injetado sequencialmente; na calibração em MISER os cinco pontos da curva de calibração são injetados sequencialmente e representados em um mesmo cromatograma (posteriormente denominado “misergrama”); por fim, na calibração em MISER com OPIS a representação é feita com seis picos, sendo cinco pontos da curva de calibração e um pico do OPIS.

Estes experimentos foram conduzidos em bateladas diárias, compostas por triplicatas de cada um dos tipos acima mencionados, repetidas quatro vezes em datas aleatórias espaçadas por intervalos de no

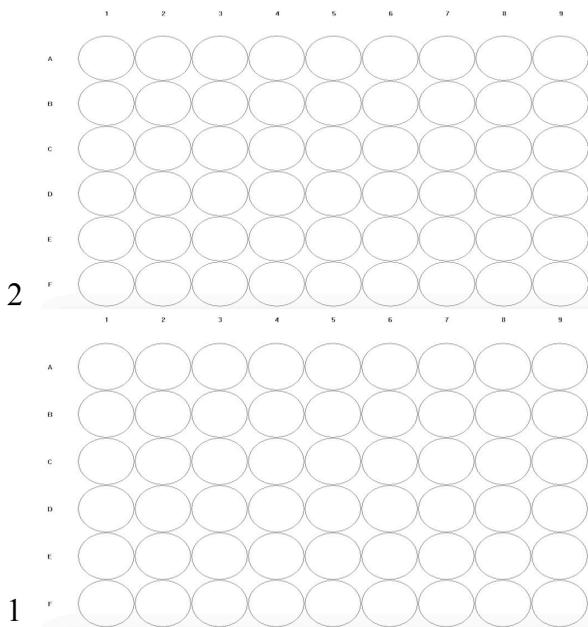
mínimo três dias. Nestes intervalos de tempo o mesmo sistema LC-ESI-MS/MS foi utilizado, com outras colunas, para análises de outros analitos em matrizes diversas, como plasma de peixe e extratos de plantas.

4.5 Amostrador automático

4.5.1 Programação de injeção

No módulo de injeção do HPLC Agilent 1200 Series os *vials* com as amostras são inseridos no amostrador automático no formato de duas placas com capacidade para 54 amostras cada. Estas são posicionadas uma à frente da outra, sendo associado o número 1 à placa frontal e o número 2 à placa traseira. Para fácil localização dos *vials* nas placas, à cada linha é associada uma letra, de A até F, e à cada coluna um número sequencial de 1 a 9. A Figura 9 apresenta esta descrição.

Figura 9: Conformação das amostras em placas para 54 *vials* no HPLC Agilent 1200 Series.



Esta informação é importante para o entendimento da programação do amostrador automático ao instruí-lo sobre a localização da amostra em cada injeção. Desta maneira, a amostra localizada na placa 1, linha A e coluna 1 é endereçada como “P1-A-01”; a amostra na placa 2, linha C e coluna 7, “P2-C-07”; e assim por diante.

Assim, para a construção de uma curva de calibração de clindamicina com cinco pontos por injeções múltiplas, as soluções padrão de 2, 4, 6, 8 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram inseridas nas posições P1-A-01, P1-A-02, P1-A-03, P1-A-04 e P1-A-05 respectivamente. O amostrador automático foi programado conforme a rotina apresentada na Tabela 3. A curva de calibração por injeções múltiplas adicionada do OPIS foi feita de modo similar com uma injeção a mais, onde as etapas 7, 8 e 9 são repetidas ao término da nona, totalizando 17 etapas (Tabela 4).

Tabela 3: Rotina programada para construção de uma curva de calibração de 5 pontos em MISER com o amostrador automático.

Etapa	Informação complementar
1. Succionar amostra	Local: P1-A-01
2. Injetar amostra	Volume: Pré-definido (1 μL)
3. Aguardar	Tempo: 0,10 minutos
4. Succionar amostra	Local: P1-A-02
5. Injetar amostra	Volume: Pré-definido (1 μL)
6. Aguardar	Tempo: 0,10 minutos
7. Succionar amostra	Local: P1-A-03
8. Injetar amostra	Volume: Pré-definido (1 μL)
9. Aguardar	Tempo: 0,10 minutos
10. Succionar amostra	Local: P1-A-04
11. Injetar amostra	Volume: Pré-definido (1 μL)
12. Aguardar	Tempo: 0,10 minutos
13. Succionar amostra	Local: P1-A-05
14. Injetar amostra	Volume: Pré-definido (1 μL)

Tabela 4: Rotina programada para construção de uma curva de calibração de 5 pontos mais *padrão interno em plugue externo* em MISER com o amostrador automático.

Etapa	Informação complementar
1. Sccionar amostra	Local: P1-A-01
2. Injetar amostra	Volume: Pré-definido (1 μ L)
3. Aguardar	Tempo: 0,10 minutos
4. Sccionar amostra	Local: P1-A-02
5. Injetar amostra	Volume: Pré-definido (1 μ L)
6. Aguardar	Tempo: 0,10 minutos
7. Sccionar amostra	Local: P1-A-03
8. Injetar amostra	Volume: Pré-definido (1 μ L)
9. Aguardar	Tempo: 0,10 minutos
10. Sccionar amostra	Local: P1-A-03
11. Injetar amostra	Volume: Pré-definido (1 μ L)
12. Aguardar	Tempo: 0,10 minutos
13. Sccionar amostra	Local: P1-A-04
14. Injetar amostra	Volume: Pré-definido (1 μ L)
15. Aguardar	Tempo: 0,10 minutos
16. Sccionar amostra	Local: P1-A-05
17. Injetar amostra	Volume: Pré-definido (1 μ L)

Para ambas as rotinas acima apresentadas as etapas 14, da Tabela 3, e 17, da Tabela 4, não precisam necessariamente ser as últimas da sequência. Após a injeção dos últimos pontos das curvas de calibração abre-se a possibilidade para a injeção sequencial de um número x de amostras limitado apenas pela capacidade do amostrador automático.

Nos ensaios para construção das curvas de calibração externas simples com OPIS o injetor automático foi programado conforme segue, onde o **X** (Etapa 1, Local) é substituído pelo número da coluna onde se encontra o frasco (*vial*) contendo cada um dos pontos da curva. Esta rotina foi repetida cinco vezes por curva de calibração, sendo obtidos cinco cromatogramas, cada um contendo um ponto da curva mais o pico do OPIS.

Tabela 5: Rotina programada para construção das curvas de calibração externas simples com *padrão interno em plugue externo* por injeções múltiplas.

Etapa	Informação complementar
1. Sccionar amostra	Local: P1-A-0X
2. Injetar amostra	Volume: Pré-definido (1 μ L)
3. Aguardar	Tempo: 0,10 minutos
4. Sccionar amostra	Local: P1-A-03
5. Injetar amostra	Volume: Pré-definido (1 μ L)

Para curvas de calibração externas simples (não-MISER) o amostrador automático foi utilizado em seu modo padrão (*default*), sem qualquer programação adicional.

4.5.2 Teste de precisão

A precisão do injetor automático foi avaliada, em cinco volumes de injeção (0,2; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 μL), pelo seu desvio padrão relativo (RSD, do inglês, *Relative Standard Deviation*). Para cada um dos níveis de injeção foram realizadas cinco injeções com um padrão de tolueno a $85 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em metanol grau HPLC.

4.5.3 Cálculos e testes estatísticos

Os tratamentos estatísticos dos dados foram realizados através dos cálculos de desvio padrão, média aritmética e desvio padrão relativo, conforme apresentado nas Equações 2, 3 e 4 abaixo, respectivamente.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - m)^2}{n - 1}} \quad \text{Equação 2}$$

Onde s é o desvio padrão, x_i os dados de entrada, n o número de dados e m sua média aritmética.

$$m = \frac{1}{n} \sum x_i \quad \text{Equação 3}$$

Onde m é média aritmética, x_i os dados de entrada e n o número de dados.

$$RSD = 100 \frac{s}{m} \quad \text{Equação 4}$$

Onde m é média aritmética e s o desvio padrão.

Todas as regressões lineares foram calculadas pela Equação 2 anteriormente apresentada. Os cálculos de limite de detecção (LOD, do inglês, *Limit of Detection*) e limite de quantificação (LOQ, do inglês,

Limit of Quantitation) do método foram avaliados pela relação sinal/ruído, conforme consta na Equação 5, no ponto mais baixo da curva.

$$LOD/LOQ = C \frac{F}{S/R} \quad \text{Equação 5}$$

Onde C é a concentração do analito na solução injetada, S/R é a relação sinal-ruído e F o fator igual a 3 para o cálculo do LOD – ou seja, o sinal do analito deve ser 3 vezes maior que aquele apresentado para o ruído – e igual a 10 para o cálculo do LOQ (RIBANI, 2004).

Os testes de hipóteses foram realizados com os suplementos *Solver* e *Ferramenta de Análises* do Microsoft Excel® através do teste *t* de Student.

5. Resultados e discussões

5.1 Caracterização e ionização dos analitos no MS

Nesta etapa, o primeiro passo é a escolha do modo de ionização a ser utilizado: positivo ou negativo. Em modo positivo, procura-se pela massa do analito acrescida de um próton (H^+), enquanto, em modo negativo, busca-se pela massa do analito desprotonada. Conforme pode ser observado na Tabela 1 os três compostos de interesse possuem caráter levemente básico. Sabe-se, contudo, que analitos básicos apresentam sinais de maior intensidade quando analisados com polaridade positiva, ocorrendo o oposto para analitos ácidos e, portanto, sendo favorecidos pela aplicação de polaridade negativa ao capilar da fonte ESI. Por este motivo foi escolhido o modo de ionização positivo para detecção dos compostos alvos da aplicação deste estudo.

Como a intensidade do sinal relacionado à molécula alvo pelo espectrômetro de massas é proporcional à sua ionização, torna-se importantíssima a escolha do solvente utilizado na solução padrão de infusão para otimização dos parâmetros de ionização. Em outras palavras, o solvente infundido pode influenciar na capacidade de ionização da molécula. Sabe-se também que moléculas que apresentam caráter ácido-base participam deste mecanismo de ionização. Este fenômeno é dado pela capacidade que estas moléculas têm em modificar o pH do meio em que se encontram, favorecendo a protonação ou desprotonação dos sítios ionizáveis dos compostos na amostra.

Faz-se, portanto, notável a importância na utilização de aditivos, como ácido fórmico ou ácido acético, para ionização em modo positivo, e carbonato ou hidróxido de amônio para ionização em modo negativo. Muito embora seja normal que qualquer substância seja capaz de ser ionizada em qualquer um dos modos, positivo ou negativo, o uso dos aditivos ácidos e básicos corrobora para o aumento da estabilidade e da intensidade do sinal. Como já mencionado os analitos deste trabalho apresentam caráter levemente básico e, por este motivo, optou-se por uma solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% como solvente de infusão e constituinte da fase móvel, favorecendo a ionização em modo positivo.

A escolha dos solventes orgânicos empregados na cadeia analítica também podem influenciar diretamente na formação do aerossol, conseqüentemente, no sinal. Esta influência é dada por suas propriedades físico-químicas como tensão superficial, que afeta o potencial aplicado no capilar da fonte ESI, condutividade elétrica, que infere na corrente elétrica

do aerossol, e viscosidade, que auxilia na definição do tamanho de gota formada. Para esta aplicação a acetonitrila foi escolhida como solvente das soluções e constituinte da fase móvel por apresentar menor viscosidade que o metanol (0,34 conta 0,60 cP).

Os íons precursores $[M+H]^+$ foram monitorados segundo aquisição dos espectros de massas no primeiro quadrupolo (Q1) em modo de Aquisição de Canais Múltiplos (MCA, do inglês, *Multiple Channel Acquisition*).

Concluídas estas etapas em Q1 as energias de ionização e fragmentação foram otimizadas. Estas são fundamentais para a aquisição de um sinal de qualidade uma vez que o deslocamento dos íons através do triploquadrupolo é dado pelos parâmetros Potencial de Desagregação (DP, do inglês, *Declustering Potential*), Potencial de Entrada (EP, do inglês, *Entrance Potential*, parâmetro de chegada do íon precursor juntamente com o DP), Potencial de Entrada na Cella de Colisão (CEP, do inglês, *Cell Entrance Potential*, entrada do íon na cela de colisão), Energia da Colisão (CE, do inglês, *Collision Energy*, energia utilizada na fragmentação do íon precursor) e Potencial de Saída da Cella de Colisão (CXP, do inglês, *Cell Exit Potential*, energia de saída da cela de colisão e posterior chegada ao terceiro e último estágio, o segundo analisador de massas). Optou-se pela otimização em modo automático.

Devido à sua sensibilidade e seletividade o modo MRM foi o escolhido. Este monitoramento é feito pelos produtos de razão massa/carga (m/z) específicas após a fragmentação do íon precursor.

Ao fim das otimizações foram obtidos um fragmento majoritário, utilizado para quantificação, um fragmento minoritário, utilizado para identificação, e os melhores valores de ionização e fragmentação para os três analitos. As Tabelas 6 e 7 abaixo apresentam estes resultados.

Tabela 6: Energias e potenciais otimizados para análise em MRM de clindamicina, azitromicina e eritromicina.

Analito	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (eV)	CXP (V)
Clindamicina	46	6	96	21	6
Eritromicina	56	5	28	37	4
Azitromicina	66	8	32	81	4

Tabela 7: Íon precursor, íon produto 1 e íon produto 2 em MRM da clindamicina, eritromicina e azitromicina.

Analito	Íon precursor	Íon produto 1	Íon produto 2
Clindamicina	425,0	377,0	335,3
Eritromicina	734,3	157,9	558,2
Azitromicina	749,6	82,9	158,3

5.2 Desenvolvimento do método cromatográfico

Colunas com fase estacionária C_8 e C_{18} foram testadas, mas apresentaram picos assimétricos ou deformados e, portanto, foram excluídas dos experimentos subsequentes. Os respectivos cromatogramas de cada analito – extraídos a partir do cromatograma principal para melhor visualização – podem ser observados nas Figuras 10 e 11.

Figura 10: Cromatogramas da azitromicina (superior), eritromicina (centro) e clindamicina (inferior) em coluna ZORBAX Eclipse XDB- C_8 (150 mm x 2,1 mm x 3,5 μm), fase móvel 80% solvente A e 20% de solvente B; fluxo 200 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

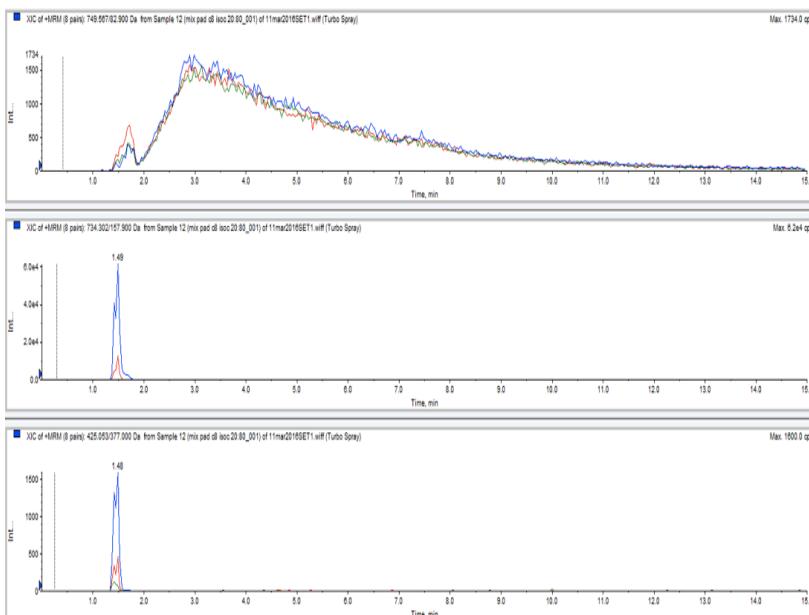
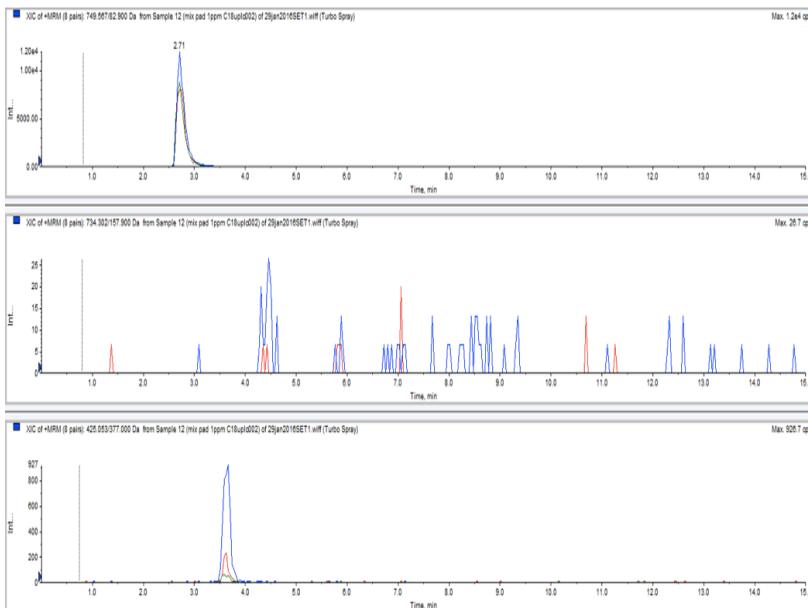


Figura 11: Cromatogramas da azitromicina (superior), eritromicina (centro) e clindamicina (inferior) em coluna Poroshell 120 EC-C₁₈ (50 mm x 4,6 mm x 2,7 µm), fase móvel 80% solvente A e 20% de solvente B; fluxo 200 µL.min⁻¹.



Como os analitos aqui apresentados possuem caráter básico ($7,79 \leq pK_a \leq 8,88$) o mais indicado seria manter a fase móvel pH em superior a 10, através o uso de aditivos. Desta maneira, a carência de íons H^+ em meio aquoso impediria a protonação dos analitos, assegurando-os em sua forma neutra. Quando se utiliza uma faixa de pH de fase móvel próxima ao pK_a de um analito espera-se que este coexista em ambas suas formas neutra e ionizada, resultando em múltiplas constantes de distribuição (k_d) para um mesmo composto. Este fenômeno, que geralmente resulta em cromatogramas com picos com caudas, largos e/ou duplicados, pode ser utilizado para explicar a aparência dos cromatogramas das Figuras 10 e 11.

Contudo, o uso de uma fase móvel com pH superior a 10 foi descartada por dois motivos: risco de danificação das colunas por trabalhar em faixas de pH próximas ou acima das recomendadas pelo fabricante; diminuição da eficiência de ionização frente aos aditivos doadores de prótons para detecção por espectrometria de massas em modo positivo. Desta forma, optou-se por uma solução aquosa de ácido fórmico

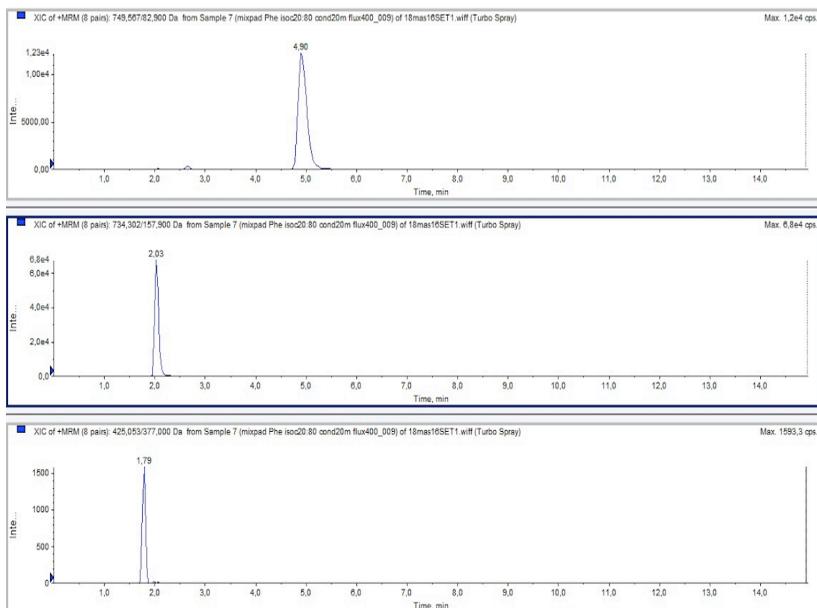
a 0,1% para favorecer a ionização. Como fase orgânica optou-se pela acetonitrila por dois motivos, sendo 1) a menor viscosidade, que favorece a formação do aerossol na fonte ESI, e 2) por apresentar maior força cromatográfica frente ao metanol. Por ser um solvente mais forte, a acetonitrila interage mais fortemente com os analitos, diminuindo seu tempo de retenção ao uso do metanol; isto é particularmente importante para redução do tempo de análise e aumento da frequência analítica. Em testes preliminares, os picos eluídos com metanol apresentaram deformidades ou assimetria e os experimentos foram descontinuados.

Em HPLC existem dois tipos de modos de eluição: gradiente e isocrático. Em sua configuração clássica, a eluição em gradiente utiliza de duas ou mais bombas de fase móvel de modo a permitir que a proporção entre solventes seja modificada como função do tempo; já em modo isocrático – utilizado neste trabalho – um mesmo solvente, ou mistura de solventes, adotado como fase móvel é mantido em proporção constante ao longo de toda a corrida cromatográfica. A composição de 80% de Solvente A (5% de água em acetonitrila) e 20% de Solvente B (solução aquosa de ácido fórmico 0,1%) foi utilizada neste trabalho por ser aquela que forneceu menor tempo de retenção para a clindamicina (analito escolhido para as os experimentos com curvas de calibração), promovendo boa separação entre os três antibióticos a um fluxo constante de $400 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Fluxos maiores e menores também foram experimentados; no entanto, enquanto os fluxos de 300 e $200 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ apresentaram picos mais retidos e largos, a $500 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ a fonte de ionização requeria temperatura muito elevada para formação do aerossol, ocasionando no desprendimento da peneira molecular do espectrômetro de massas.

Apesar de o modo gradiente ser capaz de possibilitar a separação de misturas muitas vezes impossíveis no modo isocrático, o método aqui proposto precisaria, necessariamente, ser isocrático devido a intenção de utilizá-lo com a técnica de injeções múltiplas (MISER).

A Figura 12 apresenta o cromatograma das condições cromatográficas desenvolvidas: injeção de $1 \mu\text{L}$, coluna Synergi Polar-RP Phenyl ($150 \text{ mm} \times 2 \text{ mm} \times 4 \mu\text{m}$) a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, fase móvel 80% solvente A (5% água em acetonitrila) e 20% de solvente B (solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%) em fluxo a $400 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ com detecção por espectrometria de massas em modo positivo.

Figura 12: Cromatogramas da azitromicina (superior), eritromicina (centro) e clindamicina (inferior) em coluna Synergi Polar-RP Phenyl (150 mm x 2 mm x 4 μ m), fase móvel 80% solvente A e 20% de solvente B; fluxo 400 μ L.min⁻¹.

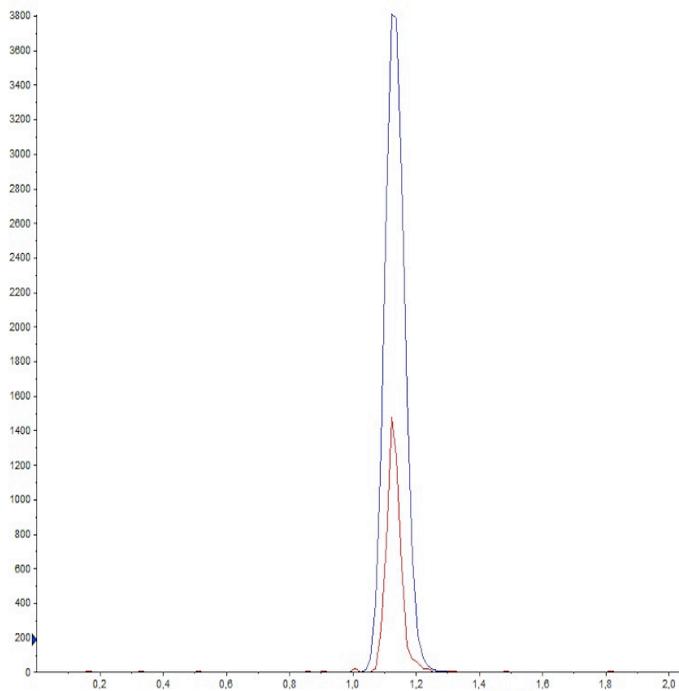


Pelo fato de os três analitos não coexistirem em uma mesma formulação farmacêutica, não haveria a necessidade de separá-los. Em todo caso, as condições cromatográficas escolhidas promoveram tanto a separação dos três compostos como picos com boa forma, intensidade e tempos de retenção relativamente baixos, principalmente no caso da clindamicina e eritromicina.

Os experimentos realizados nas subsequentes etapas, envolvendo injeções múltiplas e construção de curvas de calibração, foram realizados não mais com misturas dos três analitos, mas com soluções padrão da clindamicina isolada. A mesma foi escolhida por ser o analito menos retido nas condições cromatográficas desenvolvidas, fornecendo, portanto, as corridas cromatográficas de menor duração.

A Figura 13 apresenta o cromatograma da injeção de um padrão de clindamicina a 2 μ g.mL⁻¹ nestas mesmas condições cromatográficas.

Figura 13: Cromatograma da clindamicina a $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em coluna Synergi Polar-RP (150 mm x 2 mm x $4 \mu\text{m}$), fase móvel 80% solvente A e 20% de solvente B; fluxo $400 \mu\text{L.min}^{-1}$.



5.3 Otimização das injeções múltiplas

As técnicas de injeções múltiplas permitem a análise em fluxo de amostras distintas. Nesta, um mesmo analito pertencente a amostras diferentes pode aparecer em momentos distintos em um mesmo misergrama (“cromatograma de injeções múltiplas”), onde seus tempos de eluição são dependentes de sua retenção cromatográfica e do espaçador que o separa do pico subsequente. Enquanto a primeira eluição do analito é determinada por sua retenção, as subsequentes são determinadas pelo tempo em que o amostrador automático deverá permanecer em repouso até que se inicie a próxima injeção.

Nesta etapa foram definidos o número de injeções, a sequência em que serão feitas e o tamanho dos plugues de fase móvel (espaçadores). Conforme mencionado anteriormente, quatro diferentes estratégias de calibração foram comparadas, sendo que em três delas as injeções múltiplas foram utilizadas, ficando de fora apenas a estratégia clássica de padronização externa. Na Figura 14 constam cinco misergramas, cada um contendo um ponto da curva de calibração mais o *padrão interno em plugue externo*, também à 6 ppm, pertencentes à denominada calibração externa simples com *padrão interno em plugue externo*. Os misergramas das Figuras 15 e 16 apresentam, respectivamente, as curvas analíticas de clindamicina construídas por injeções múltiplas sem e com o *padrão interno em plugue externo*. Pela comparação dos dois misergramas a diferença fica evidente sendo que, na Figura 15, enquanto os cinco picos são crescentes, na Figura 16 os terceiro e quarto picos apresentam respostas muito próximas justamente por se tratarem da mesma concentração: o terceiro ponto da curva e o padrão interno, ambos à 6 ppm.

Figura 14: Misogramas de uma curva de calibração externa simples adicionada do OPIS por uma injeção adicional nas condições cromatográficas adotadas. Todos os picos são referentes a padrões de clindamicina nas concentrações A) 2 e 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, B) 4 e 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, C) 6 e 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, D) 8 e 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e E) 10 e 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

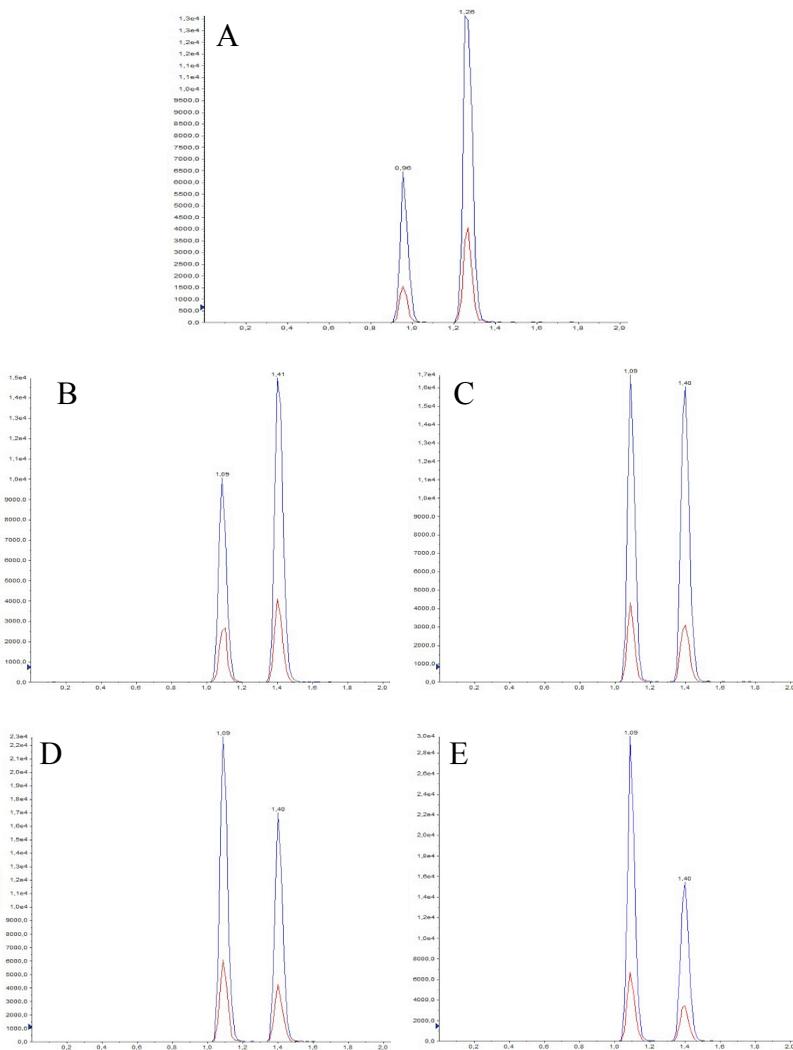


Figura 15: Misergrama de uma curva de calibração externa em MISER, sem OPIS, com cinco pontos nas condições cromatográficas adotadas. Todos os picos são referentes a padrões de clindamicina nas concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente.

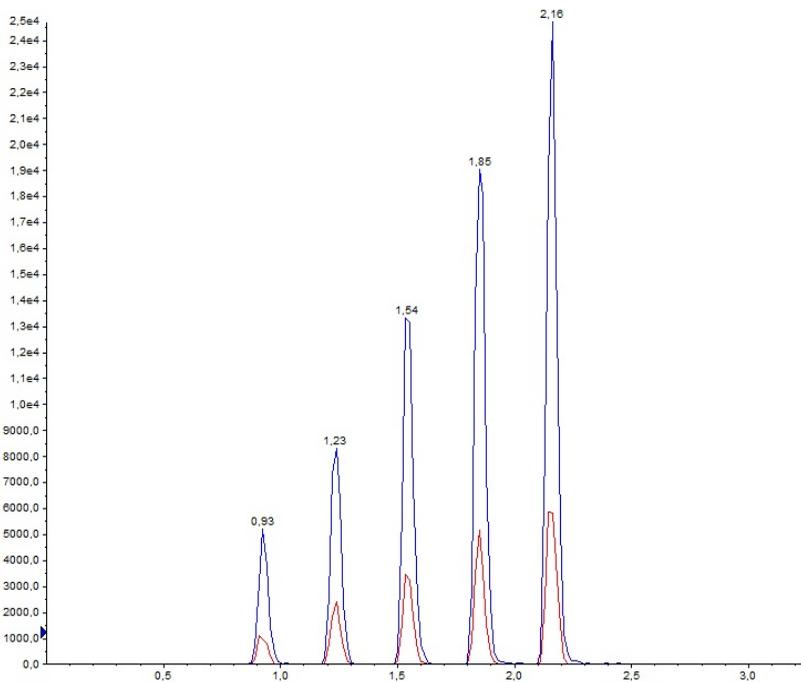
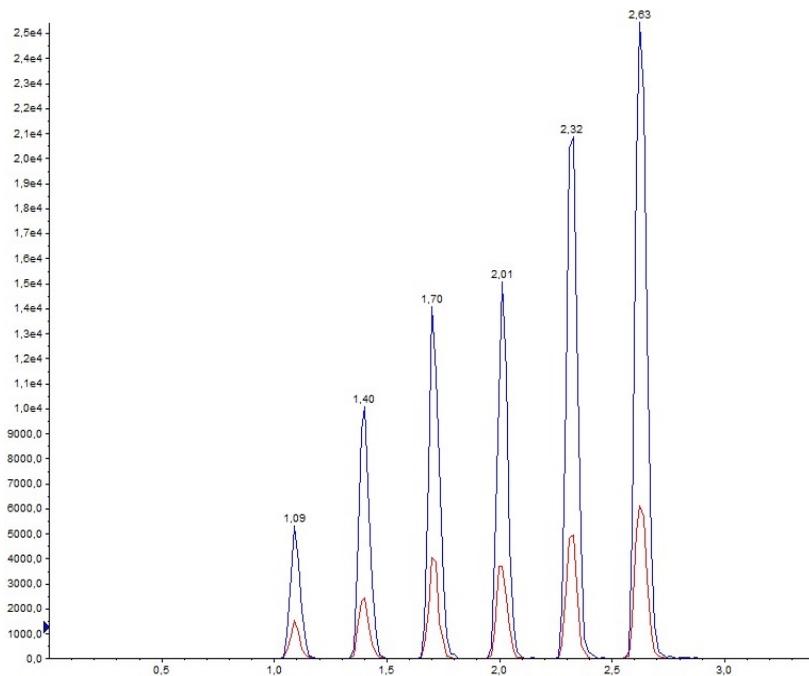


Figura 16: Misergrama de uma curva de calibração externa em MISER com uso do OPIS com cinco pontos nas condições cromatográficas adotadas. Todos os picos são referentes a padrões de clindamicina nas concentrações de 2, 4, 6, 6 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente.



Em MISER, os analitos são então separados temporalmente ao invés de cromatograficamente. Esta separação temporal é dada por múltiplas injeções espaçadas por plugues de fase móvel definidos por um hiato entre cada injeção. Em outras palavras, quanto mais tempo se demora entre uma e outra injeção, maior será o espaçamento entre os picos. Este espaçamento, ou a distância entre dois picos, em cromatografia, é denominado *resolução*. As maneiras mais usuais de se calcular a resolução cromatográfica entre dois picos são dadas pelas Equações 2 e 3:

$$R_s = \frac{2(t_b - t_a)}{W_a + W_b} \quad \text{Equação 2}$$

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \cdot \frac{K_b'}{(1 + K_b')} \quad \text{Equação 3}$$

Na Equação 2, t_b e t_a são os tempos de retenção dos analitos mais e menos retidos, respectivamente, e W as larguras de pico. Na Equação 3, N é o número de pratos teóricos da coluna, α é o fator seletividade e K_b' o fator de retenção do analito mais retido.

No sistema Agilent 1200 Series, no módulo do amostrador automático, cronometrou-se que a seringa demora 12 segundos, nas condições fixadas, para concluir cada ciclo de injeção. Portanto, mesmo sem inserir um espaçador programado, o próprio amostrador automático introduz um plugue “forçado” de 12 segundos entre cada uma das injeções da série. Calculando pela Equação 2, os misergramas com espaçadores de 12 segundos apresentaram picos com resolução aproximada de 1,1. Examinando esta equação percebe-se que a resolução é dependente apenas da largura dos picos e seus tempos de retenção. Os tempos de retenção, por sua vez, podem ser controlados pela variação dos espaços entre os picos. Desta forma, de modo a se obter a resolução desejada (maior ou igual a 1,5) entre os picos do misergrama, foram inseridos espaçadores de 0,10 minutos entre eles; como as condições cromatográficas permaneceram constantes as larguras de pico não foram alteradas. Apesar de parecer preciosismo, este aumento de 6 segundos entre os picos elevaram a resolução de 1,1 para 1,7 em todos os misergramas e para quaisquer dois pares de picos.

Voltando então a avaliar a Equação 3, percebe-se a presença de variáveis associadas às interações entre o analito A (menos retido) e o analito B (mais retido) com as fases estacionária e móvel. No entanto, apesar de as interações cromatográficas existirem, reforça-se que a separação de picos de mesmo analito em MISER não é dada por interações cromatográficas, mas sim pelo tamanho do espaçador. Além disso, neste caso os picos A e B são exatamente do mesmo composto, tornando impossível não somente separá-los com cromatografia convencional como também esta não permitiria a análise de um número indeterminado amostras em um único cromatograma.

Nos misergramas anteriormente apresentados nas Figuras 13, 14, 15 e 16, portanto, as amostras injetadas foram as soluções padrão de clindamicina, onde a quantidade de picos é igual ao número de injeções.

5.4 Construção e comparativos das curvas analíticas

Para os experimentos de construção das curvas de calibração a clindamicina foi escolhida por ser o analito menos retido nas condições cromatográficas desenvolvidas, fornecendo, portanto, as corridas cromatográficas de menor duração. Cada um dos quatro tipos de curva analítica estudados foi realizado em triplicata e em quatro dias aleatoriamente espaçados, totalizando 48 regressões lineares para cada dia. Nestes intervalos de tempo o mesmo equipamento LC-ESI-MS/MS foi utilizado por outros analista do mesmo grupo de pesquisa para o desenvolvimento de outros trabalhos.

A primeira curva analítica estudada foi a externa simples com os cinco pontos integrantes da faixa de aplicação. Cada um dos pontos dessas curvas é apresentado em cromatogramas distintos com eluição finalizada em até 1,4 minuto. A Tabela 8 apresenta os coeficientes angular a (inclinação, ou *slope*), linear b (intercepto) e de determinação R^2 (ajuste dos pontos à reta) para cada umas das curvas analíticas externas construídas.

Tabela 8: Coeficiente de determinação, coeficiente angular e coeficiente linear de cada curva de calibração externa simples construída ao longo de 4 dias aleatoriamente escolhidos.

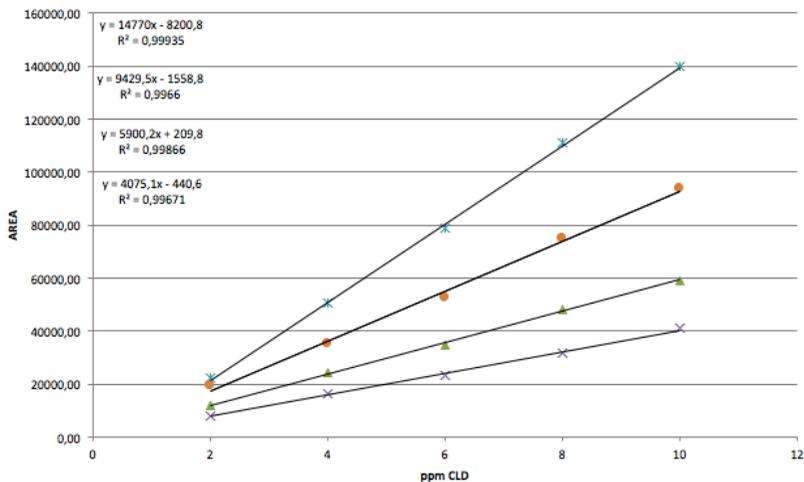
Descrição	R^2	Inclinação	Intercepto
Dia 1 – Curva 1	0,9974	14985	-9484
Dia 1 – Curva 2	0,9997	14504	-6798
Dia 2 – Curva 3	0,9989	14820	-8320
Dia 2 – Curva 1	0,9975	9261	-392
Dia 2 – Curva 2	0,9906	9528	-2095
Dia 2 – Curva 3	0,9986	9499	-2184
Dia 3 – Curva 1	0,9899	6059	422
Dia 3 – Curva 2	0,9961	5745	990
Dia 3 – Curva 3	0,9984	5896	-783
Dia 4 – Curva 1	0,9978	3147	775
Dia 4 – Curva 2	0,9878	3973	-790
Dia 4 – Curva 3	0,9990	5105	-1306
Média	0,9960	8544	-
Desvio padrão	0,0041	4282	-
RSD (%)	0,41	50,1	-

Analisando os valores obtidos percebe-se que, em todas as curvas, e independentemente do dia em que foi feita, o ajuste dos pontos ao modelo linear foi sempre excelente, apresentando valor mínimo de 0,9878, máximo de 0,9997 e desvio padrão relativo (RSD) igual a 0,39%.

O mesmo não pode ser afirmado na análise populacional das inclinações, demonstrando valores de mínimos e máximo iguais a 3147 e 14985, respectivamente, com um desvio padrão relativo de aproximadamente 50%, tornando inviável a utilização destas curvas para análises *interday*. Avaliando este RSD juntamente com aqueles das curvas preparadas dentro de um mesmo dia, com valores variando de 1,27% a 19,70%, apontam a necessidade do uso de um padrão interno para análises quantitativas.

A Figura 17 apresenta as curvas analíticas médias diárias representadas em um mesmo plano cartesiano, facilitando a visualização das disparidades de sensibilidade. Enfatiza-se aqui que a sensibilidade das curvas não foi decrescente, mas sim aleatória. Isto elimina a hipótese de supressão sistemática da sensibilidade por parte de sujidades no espectrômetro de massas e/ou degradação da clindamicina.

Figura 17: Curvas de calibração externas simples médias diárias.



A exatidão *intraday* foi avaliada pela recuperação dos pontos pertencentes à curva 1 na curva 2, da curva 2 na curva 3 e da curva 3 na curva 1. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Resultados dos testes de recuperação das curvas de calibração externas simples.

Descrição	Recuperação (%)				
	2 ppm	4 ppm	6 ppm	8 ppm	10 ppm
Dia 1 – Curva 1	107,9	99,7	98,5	99,0	100,8
Dia 1 – Curva 2	99,5	96,6	96,8	103,7	101,1
Dia 2 – Curva 3	102,7	101,3	98,4	99,9	98,7
Dia 2 – Curva 1	98,4	96,6	96,2	101,0	101,1
Dia 2 – Curva 2	112,3	98,5	97,6	101,8	98,6
Dia 2 – Curva 3	117,6	96,0	93,3	101,4	102,5
Dia 3 – Curva 1	85,5	90,3	96,4	96,3	93,9
Dia 3 – Curva 2	103,4	106,6	95,1	109,1	103,8
Dia 3 – Curva 3	105,9	112,4	100,7	99,2	101,4
Dia 4 – Curva 1	132,0	148,5	147,1	153,1	157,1
Dia 4 – Curva 2	98,3	92,4	82,7	84,4	83,6
Dia 4 – Curva 3	86,5	84,9	75,0	75,3	82,0
Média	104,2	102,0	98,2	102,0	102,0
Desvio padrão	12,8	16,3	17,1	18,4	18,8
RSD (%)	12,2	16,0	17,4	18,1	18,4

Como se pode observar, as curvas apresentaram uma boa recuperação de modo geral. Os resultados mais destoantes da população encontram-se apenas nas curvas 1 e 3 do dia 4. Isto é dado pelo fato de a terceira curva do quarto dia ter apresentado sensibilidade acentuada. Portanto, quando os valores mais baixos da curva 2 foram inseridos na curva 3 as recuperações ficaram baixas; já quando os altos valores dos pontos da curva 3 foram introduzidos na primeira curva, as recuperações, naturalmente, ficaram em torno de 50% acima do desejado.

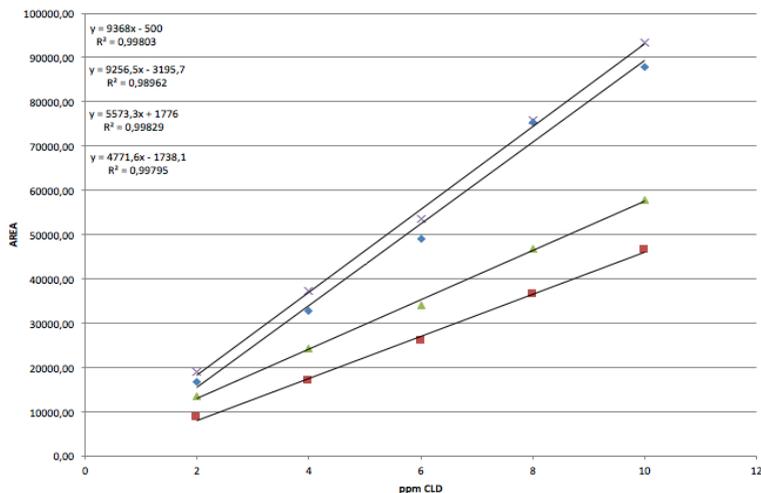
A seguir, na Tabela 10, seguem os coeficientes das regressões lineares das curvas analíticas externas com injeções múltiplas.

Tabela 10: Coeficiente de determinação, coeficiente angular e coeficiente linear de cada curva de calibração externa construída por MISER ao longo de 4 dias aleatoriamente escolhidos.

Descrição	R²	Inclinação	Intercepto
Dia 1 – Curva 1	0,9953	9340	-1537
Dia 1 – Curva 2	0,9964	9195	1146
Dia 2 – Curva 3	0,9997	9569	-1109
Dia 2 – Curva 1	0,9864	9128	-2786
Dia 2 – Curva 2	0,9947	9040	-1684
Dia 2 – Curva 3	0,9852	9602	-5117
Dia 3 – Curva 1	0,9928	5600	901
Dia 3 – Curva 2	0,9983	5419	2873
Dia 3 – Curva 3	0,9951	5702	1554
Dia 4 – Curva 1	0,9933	4795	-3181
Dia 4 – Curva 2	0,9941	4832	-1464
Dia 4 – Curva 3	0,9894	4689	-569
Média	0,9934	7242	-
Desvio padrão	0,0044	2189	-
RSD (%)	0,44	30,2	-

Pela análise dos coeficientes de determinação ($R^2_{\text{Médio}} = 0,9934$) pode-se afirmar que todas as curvas apresentaram bons ajustes ao modelo matemático. Em adição, o desvio padrão relativo nos informa acerca da precisão, indicando, portanto, boa reprodutibilidade da técnica na elaboração das curvas analíticas. Por outro lado, mais uma vez a sensibilidade do detector mostrou-se problemática ao apresentar variação média de aproximadamente 30% (RSD).

Novamente, são apresentadas abaixo, na Figura 18, as curvas analíticas médias diárias. Mais uma vez fica evidente a disparidade entre os quatro *slopes*.

Figura 18: Curvas de calibração externas em MISER médias diárias.

Com a finalidade de avaliar a exatidão realizou-se o mesmo procedimento acima aplicado. Estes resultados são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Resultados dos testes de recuperação das curvas de calibração externas em MISER.

Descrição	Recuperação (%)				
	2 ppm	4 ppm	6 ppm	8 ppm	10 ppm
Dia 1 – Curva 1	106,2	104,3	101,5	103,1	103,3
Dia 1 – Curva 2	95,7	93,4	90,6	99,8	99,5
Dia 2 – Curva 3	107,9	103,7	96,1	102,3	97,5
Dia 2 – Curva 1	101,3	95,2	93,5	109,6	100,6
Dia 2 – Curva 2	103,3	92,4	94,0	106,8	97,4
Dia 2 – Curva 3	115,7	103,7	94,7	102,1	97,2
Dia 3 – Curva 1	111,9	105,9	97,7	106,4	102,8
Dia 3 – Curva 2	92,1	97,4	89,1	99,4	101,5
Dia 3 – Curva 3	109,2	97,5	101,4	96,4	97,8
Dia 4 – Curva 1	128,8	111,4	100,4	110,6	101,6
Dia 4 – Curva 2	90,5	84,0	96,2	90,9	97,8
Dia 4 – Curva 3	105,3	97,0	94,1	99,5	103,7
Média	105,7	98,8	95,8	102,2	100,1
Desvio padrão	10,6	7,4	4,0	5,6	2,5
RSD (%)	10,0	7,45	4,15	5,49	2,49

A principal vantagem em se utilizar MISER para a construção de curvas de calibração está no potencial ganho em frequência analítica pela redução no tempo total de análise ao proceder com injeções consecutivas das amostras após as injeções da curva de calibração. Tendo isto em vista, apesar de o método ideal para avaliação da exatidão dessas curvas ser justamente pela injeção sequencial de amostras de concentração conhecida, o método adotado não foi a segunda melhor opção. Isto porque, como as três curvas foram injetadas em sequência programada o tempo máximo decorrido entre as primeiras e terceiras curvas foi igual à duração de cada corrida mais 1 minuto de condicionamento prévio anterior à cada corrida, totalizando 12 minutos desde o condicionamento da primeira corrida até o término da terceira.

Isto acertado, os resultados da Tabela 11 apontam valores de recuperação ainda melhores do que aqueles do método convencional. Um provável motivo para este ganho está justamente na diminuição do tempo total de análise, que foi reduzido de 45 (2 minutos por corrida mais 1 minuto de condicionamento prévio) para 12 minutos. Esta redução de tempo foi significativa ao não permitir uma janela de tempo tão longa para que o espectrômetro de massas viesse a sofrer uma variação como àquela observada nas curvas analíticas simples do quarto dia de ensaios.

No mais, apesar ter apresentado resultados semelhantes ao método clássico primeiramente apresentado, e por se tratar de uma nova proposta à construção de curvas de calibração, cabe às curvas analíticas dos misergramas uma comparação com àquelas obtidas pelo método convencional. Para esta avaliação estatística é proposto um teste-*t* de Student.

O teste-*t* de Student, ou apenas teste-*t*, é um teste de hipóteses amplamente utilizado para determinar se dois conjuntos de dados são significativamente diferentes entre si. O cálculo foi realizado no *software* Microsoft Excel e o teste aplicado às duas populações de coeficientes angulares. Foram admitidas mesma variância, distribuição normal bicaudal e um intervalo de confiança de 95% para procedência dos cálculos. A Tabela 12 apresenta os resultados do teste-*t*.

Tabela 12: Resultados do teste-t aplicado às curvas analíticas externa simples (Variável 1) e em MISER (Variável 2) com um intervalo de 95% de confiança e admitindo-se variâncias iguais.

	Variável 1	Variável 2
Média	8543	7382
Variância	18332766	4139149
Observações	12	12
Variância agrupada	11235958	
Hipótese de diferença de média	0	
GL	22	
Stat t	0,848681242	
P (T<=t) unicaudal	0,20259941	
t crítico unicaudal	1,717144374	
P (T<=t) bicaudal	0,405198821	
t crítico bicaudal	2,073873068	

Avaliando os resultados observa-se que o valor calculado de t (na tabela, *Stat t*) igual a 0,85 encontra-se consideravelmente abaixo do valor crítico (t crítico bicaudal, igual a 2,07). Esta informação infere na conclusão de que não há diferença significativa entre as variáveis 1 e 2, ou seja, que os dois modelos de curvas analíticas avaliados são estatisticamente iguais, sobressaindo a técnica de MISER pela redução no tempo de análise e menor suscetibilidade em sofrer variações espectrométricas.

Para os ensaios subsequentes foi introduzida uma nova variação de padrão interno, aqui denominado OPIS. Como já comentado, a escolha de um padrão interno é uma etapa importante do desenvolvimento analítico e deve ser procedida com cautela. Também foi mencionado que o melhor padrão interno é aquele que mais é estruturalmente parecido com o(s) analito(s), podendo estes ser de difícil obtenção ou muito custosos. Nesta nova proposta de padronização interna o composto utilizado como padrão interno é a molécula mais parecida possível com o analito: o próprio analito. Assim como sugerido pela proposta nomenclatura, o uso do OPIS só é possível pelo fato de ele estar em uma solução externa à amostra e ser injetado em um plugue diferenciado. Seu uso em cromatografia convencional torna-se impossível, afinal, o OPIS e o analito são o mesmo

composto e, em mesmas condições cromatográficas, apresentam mesmo fator de retenção.

Por outro lado, enquanto um padrão interno clássico é capaz de corrigir tanto erros de detecção quanto de injeção o OPIS é apenas capaz de compensar a detecção, logicamente, uma vez que são realizadas múltiplas injeções. Com isto em vista, experimentos colaborativos foram realizados para estudar a precisão do injetor automático do mesmo HPLC Agilent 1200 Series. Abaixo são apresentados os resultados provenientes da injeção em cinco replicatas de diferentes volumes de uma solução de tolueno ($85 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em metanol grau HPLC). Os resultados foram avaliados pela área dos picos fornecidas pelo detector de arranjo de diodos.

Tabela 13: Área média (n=5), desvio padrão e desvio padrão relativo do módulo amostrador automático do HPLC Agilent 1200 Series em cinco volumes de injeção.

Volume injeção (μL)	Área média	Desvio padrão	RSD (%)
0,2	378,4	1,62	0,43
0,5	999,2	3,66	0,37
1,0	2041,3	8,83	0,43
2,0	4072,3	10,5	0,26
5,0	9755,7	14,7	0,15

Pelos resultados de RSD verifica-se que os volumes de injeção de menor precisão são 0,2 e 1,0 μL . Em todo caso, 0,43% de desvio padrão relativo é um valor baixo e isto pode ser afirmado pela análise da seguinte hipótese: supondo que no misergrama C da Figura 14, onde as injeções são provindas de soluções de mesma concentração, ambas injeções sofram a variação máxima no volume de injeção de 0,43%, uma para mais e a outra para menos, promovendo a maior diferença possível entre os dois picos; neste caso a razão entre as áreas, diferentemente da teórica esperada igual a 1, seria igual a 0,991 ou 1,009 (dependendo de qual dos picos é adotado como numerador ou denominador), aproximadamente 0,87% diferente do ideal. Em todo caso, estes erros associados à injeção já estão incorporados nas regressões lineares das curvas obtidas por MISER e podem ser indiretamente analisados pelo coeficiente de determinação R^2 de cada uma.

Dada, portanto, a alta precisão do amostrador automático, foram construídas curvas analíticas externas simples (em cromatogramas

separados) utilizando o próprio analito para a padronização interna, sendo este introduzido por uma injeção sequencial ao ponto da curva.

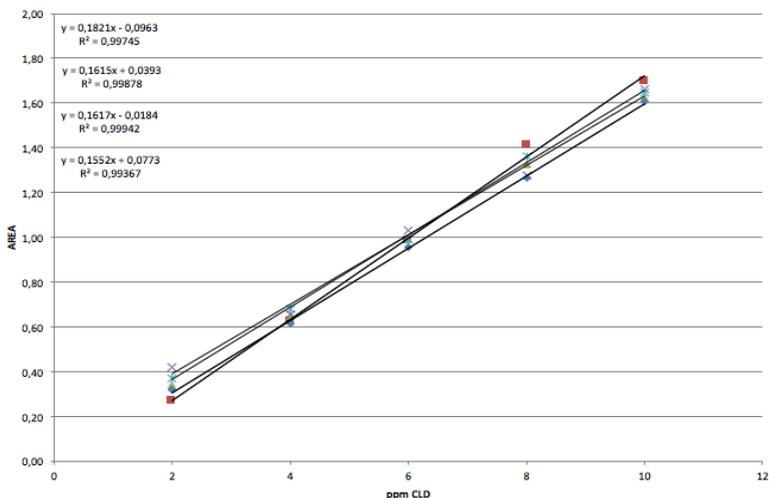
Esta proposta de calibração pode possuir duas diferentes interpretações, sendo uma literal e a outra uma aproximação. Literalmente, é apresentada uma nova estratégia para construção de curvas de calibração onde um padrão interno ideal, ou seja, o próprio analito, é adicionado ao cromatograma da amostra através de uma injeção adicional. Já a segunda aproximação seria alegar que esta estratégia pode ser análoga a uma padronização externa clássica, com um padrão interno convencional (isótopo ou similar estrutural) inserido na amostra para serem juntamente injetados e separados cromatograficamente. A coerência dessa aproximação é fundamentada em dois fatos: 1) o melhor padrão interno é o próprio analito, e 2) o erro do injetor automático é desprezível. Assim, um padrão interno, que é o próprio analito, pode ser inserido na corrida com uma injeção adicional de alta precisão. Além disso, os dois picos são separados por um espaçador temporal que mimetiza a separação cromatográfica entre o analito e seu padrão interno convencional. Abaixo, na Tabela 14, seguem os coeficientes das 12 regressões lineares traçadas para esta variação de calibração. Os cinco misergramas constituintes de uma curva de calibração deste tipo foram anteriormente apresentados na Figura 14.

Tabela 14: Coeficiente de determinação, coeficiente angular e coeficiente linear de cada curva de calibração externa simples construída com uso de OPIS por injeções múltiplas ao longo de 4 dias aleatoriamente escolhidos.

Descrição	R²	Inclinação	Intercepto
Dia 1 – Curva 1	0,9902	0,1769	-0,0771
Dia 1 – Curva 2	0,9935	0,1852	-0,1014
Dia 2 – Curva 3	0,9995	0,1840	-0,1104
Dia 2 – Curva 1	0,9957	0,1556	0,0842
Dia 2 – Curva 2	0,9986	0,1694	-0,0016
Dia 2 – Curva 3	0,9913	0,1596	0,0351
Dia 3 – Curva 1	0,9937	0,1604	-0,0108
Dia 3 – Curva 2	0,9975	0,1576	0,0047
Dia 3 – Curva 3	0,9941	0,1672	-0,0490
Dia 4 – Curva 1	0,9947	0,1400	0,1736
Dia 4 – Curva 2	0,9890	0,1704	-0,0190
Dia 4 – Curva 3	0,9890	0,1692	-0,0188
Média	0,9939	0,1663	-
Desvio padrão	0,0036	0,0127	-
RSD (%)	0,36	7,65	-

O pouco ganho em correlação entre os pontos das curvas passa praticamente despercebido frente a diferença de inclinação. Com um RSD de apenas 7,65% para a inclinação das regressões lineares e de 0,36% para o ajuste dos pontos a importância do uso de um padrão interno é demonstrado pela superioridade, em termos de precisão, desta estratégia em comparativo com as duas anteriores. A Figura 20 ilustra isso através da observação da proximidade entre as retas e seu quase paralelismo.

Figura 19: Curvas de calibração externas simples com OPIS inserido por injeções múltiplas médias diárias.



A exatidão das 12 curvas de calibração foi avaliada do mesmo modo anteriormente descrito. Os resultados estão apresentados na Tabela 15. Por causa de dois pontos de recuperação muito distantes da média (145,2% e 65,7%) observa-se que as recuperações no ponto de concentração 2 ppm apresentaram o maior RSD (17,5%) e, portanto, a pior precisão da faixa de aplicação. Ainda assim, em comparativo com a curva analítica clássica, esta estratégia demonstrou-se aproximadamente 46% superior em termos de precisão.

Tabela 15: Resultados dos testes de recuperação das curvas de calibração externas simples com OPIS por injeções múltiplas.

Descrição	Recuperação (%)				
	2 ppm	4 ppm	6 ppm	8 ppm	10 ppm
Dia 1 – Curva 1	97,3	99,4	98,8	101,8	102,7
Dia 1 – Curva 2	101,8	100,3	92,5	103,0	94,8
Dia 2 – Curva 3	100,0	97,8	105,0	105,2	98,1
Dia 2 – Curva 1	92,4	95,2	89,8	103,4	98,7
Dia 2 – Curva 2	114,1	101,1	105,3	99,2	95,3
Dia 2 – Curva 3	99,9	99,8	98,8	103,9	104,5
Dia 3 – Curva 1	98,3	91,2	105,4	98,2	102,9
Dia 3 – Curva 2	104,7	98,3	93,6	104,1	100,7
Dia 3 – Curva 3	107,7	103,2	102,4	95,4	98,3
Dia 4 – Curva 1	65,7	79,8	98,2	96,1	110,8
Dia 4 – Curva 2	145,2	101,3	103,3	94,9	93,2
Dia 4 – Curva 3	113,3	96,2	102,1	95,5	105,0
Média	103,4	97,0	99,6	100,1	100,4
Desvio padrão	18,1	6,3	5,3	3,9	5,0
RSD (%)	17,5	6,48	5,32	3,92	5,02

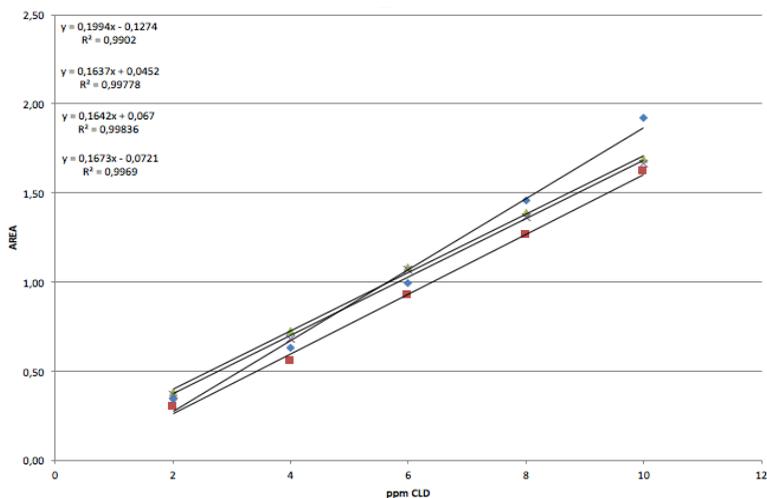
Por fim, a quarta e última estratégia de calibração que será apresentada incorpora o OPIS na construção de uma curva analítica completa por MISER. O misergrama típico desta abordagem está apresentado na Figura 16. A Tabela 16, abaixo, elenca os coeficientes das regressões lineares de cada curva analítica construída.

Tabela 16: Coeficiente de determinação, coeficiente angular e coeficiente linear de cada curva de calibração externa com OPIS em MISER construída com injeções múltiplas ao longo de 4 dias aleatoriamente escolhidos.

Descrição	R ²	Inclinação	Intercepto
Dia 1 – Curva 1	0,9968	0,1681	-0,0695
Dia 1 – Curva 2	0,9951	0,1799	-0,1109
Dia 2 – Curva 3	0,9913	0,1540	-0,0357
Dia 2 – Curva 1	0,9951	0,1844	-0,0095
Dia 2 – Curva 2	0,9972	0,1493	0,1237
Dia 2 – Curva 3	0,9930	0,1589	0,0867
Dia 3 – Curva 1	0,9991	0,1945	0,0393
Dia 3 – Curva 2	0,9918	0,1597	0,0650
Dia 3 – Curva 3	0,9988	0,1653	0,0372
Dia 4 – Curva 1	0,9875	0,2017	-0,1136
Dia 4 – Curva 2	0,9879	0,2007	-0,1365
Dia 4 – Curva 3	0,9881	0,1959	-0,1320
Média	0,9935	0,1760	-
Desvio padrão	0,0042	0,0191	-
RSD (%)	0,42	10,9	-

Pelo comparativo das duas estratégias envolvendo a injeção completa da curva de calibração em uma única corrida cromatográfica pode-se observar que, enquanto ambas apresentaram similaridade no ajuste à regressão linear, a inserção do *padrão interno em plugue externo* no misergrama promoveu um ganho de 36% em termos de precisão na sensibilidade. Mais uma vez isto pode ser observado pela plotagem das curvas médias diárias em um único gráfico, conforme apresentado abaixo na Figura 20.

Figura 20: Curvas de calibração externas em MISER com OPIS médias diárias.



Os testes de recuperação, realizados conforme anteriormente, estão apresentados na Tabela 17. Comparando estatisticamente os valores de recuperação da Tabela 17 com aqueles da Tabela 9 através de um teste-*t* comprova-se a similaridade estatística entre as duas estratégias de calibração. Através de 60 observações, a técnica clássica apresenta recuperação média igual a 101,7% contra 100,8% da curva construída através de injeções múltiplas com *padrão interno em plugue externo*. Os resultados são apresentados na Tabela 18, conforme é observado que o valor de *t* calculado (0,35) não ultrapassa o o valor crítico, igual a 1,98.

Tabela 17: Resultados dos testes de recuperação das curvas analíticas externas em MISER com OPIS.

Descrição	Recuperação (%)				
	2 ppm	4 ppm	6 ppm	8 ppm	10 ppm
Dia 1 – Curva 1	114,3	86,9	94,0	97,4	92,9
Dia 1 – Curva 2	111,1	94,3	99,5	94,2	96,9
Dia 2 – Curva 3	106,9	100,1	104,6	109,0	114,6
Dia 2 – Curva 1	104,0	99,6	97,7	96,0	88,5
Dia 2 – Curva 2	79,1	96,4	115,7	108,8	115,1
Dia 2 – Curva 3	97,3	105,0	97,3	98,3	95,1
Dia 3 – Curva 1	82,0	83,8	87,5	84,6	84,3
Dia 3 – Curva 2	111,0	116,6	122,6	119,2	119,7
Dia 3 – Curva 3	103,4	94,5	104,8	101,8	95,5
Dia 4 – Curva 1	113,7	84,8	92,1	95,1	98,8
Dia 4 – Curva 2	119,0	103,8	92,1	103,9	103,5
Dia 4 – Curva 3	120,7	96,4	96,6	99,3	106,2
Média	105,2	96,9	100,4	100,6	100,9
Desvio padrão	13,3	9,3	10,2	8,9	11,1
RSD (%)	12,6	9,59	10,1	8,79	11,0

Tabela 18: Resultados do teste-*t* aplicado às curvas externa simples com OPIS inserido por injeções múltiplas (Variável 1) e curva externa com OPIS em MISER (Variável 2) com um intervalo de 95% de confiança e admitindo-se variâncias iguais.

	Variável 1	Variável 2
Média	101,7	100,8
Variância	267,4	113,1
Observações	60	60
Variância agrupada	190,2	
Hipótese de diferença de média	0	
GL	118	
Stat t	0,347466123	
P (T<=t) unicaudal	0,364430078	
t crítico unicaudal	1,657869522	
P (T<=t) bicaudal	0,728860156	
t crítico bicaudal	1,980272249	

Relembrando a insignificância da variação no volume de injeção por erros do amostrador automático, o mesmo teste-*t* acima utilizado foi aplicado para averiguar a validade da incorporação do proposto *padrão interno em plugue externo*. Como variáveis foram adotadas as inclinações de ambas as curvas com padronização interna. Os resultados estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19: Resultados do teste-*t* aplicado às curvas externa simples com OPIS inserido por injeções múltiplas (Variável 1) e curva externa com OPIS em MISER (Variável 2) com um intervalo de 95% de confiança e admitindo-se variâncias iguais.

	Variável 1	Variável 2
Média	0,16621276	0,176044999
Variância	0,000161254	0,000365997
Observações	12	12
Variância agrupada	0,000263626	
Hipótese de diferença de média	0	
GL	22	
Stat t	1,483317721	
P(T<=t) unicaudal	0,076087795	
t crítico unicaudal	1,717144374	
P(T<=t) bicaudal	0,152175591	
t crítico bicaudal	2,073873068	

Mais uma vez pode-se observar que o *t* calculado (1,48) se encontra abaixo do valor tabelado crítico (2,07), classificando as variáveis 1 e 2 como “estatisticamente iguais”. Interpretando esta informação pode-se concluir que a aplicação do OPIS na construção da curva analítica em MISER é similar à padronização interna convencional, aqui simulada pela terceira estratégia de calibração.

Na sequência são avaliados os testes de recuperação *interday* para todas as curvas de calibração. Neste experimento, o conteúdo de uma cápsula de clindamicina foi diluído, de modo análogo ao realizado com os padrões analíticos, até a concentração de 6 ppm. Esta solução foi então recuperada em cada uma das curvas de calibração médias diárias. Os resultados são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20: Comparativo entre as recuperações no ponto 6 ppm para as curvas médias diárias.

Curva média	Recuperação (%)			
	Simples	MISER	Simples+OPIS	MISER+OPIS
Dia 1	31,2	46,6	100,3	106,9
Dia 2	37,2	52,0	99,0	94,8
Dia 3	52,9	71,6	104,8	91,8
Dia 4	81,4	95,8	99,4	94,3

Como se observa nos resultados acima a introdução do OPIS, diferentemente das técnicas sem padronização interna, possibilita que as amostras analisadas em um dia sejam propriamente quantificadas em uma curva de calibração que tenha sido construída em um dia diferente. Foi aplicado também um teste-*t* nos resultados de recuperação *interday* para as duas técnicas de padronização interna. Com o valor calculado de *t* igual a 0,97 não ultrapassando o valor crítico (3,18), pode-se afirmar que ambas estratégias são estatisticamente iguais em termos de análise *interday*.

Depois da avaliação dos resultados até então apresentados foi pensada em uma nova variação de calibração através dos mesmos dados experimentais já obtidos. A estratégia consiste na divisão de todos os pontos da curva em um misergrama por um desses próprios pontos. Desta maneira, um ponto da própria curva seria considerado também como OPIS e eliminaria a necessidade de uma injeção adicional para o mesmo, conforme proposta na estratégia de MISER+OPIS. Para realização dos testes e plotagem das curvas de calibração utilizou-se os dados das corridas por MISER, onde o pico central, igual a 6 ppm, foi eleito como OPIS (além de ser também um ponto constituinte da curva de calibração). Os parâmetros das curvas de calibração são apresentados na Tabela 21, cujo RSD das inclinações foi menor que o das demais estratégias apresentadas.

Tabela 21: Resultados dos testes de recuperação das curvas analíticas externas em MISER com o ponto 6 ppm de cada curva de calibração adotado como OPIS.

Descrição	R ²	Inclinação	Intercepto
Dia 1 – Curva 1	0,9953	0,1827	-0,0301
Dia 1 – Curva 2	0,9964	0,1700	0,0212
Dia 2 – Curva 3	0,9997	0,1729	-0,0200
Dia 2 – Curva 1	0,9864	0,1852	-0,0565
Dia 2 – Curva 2	0,9947	0,1828	-0,0340
Dia 2 – Curva 3	0,9852	0,1982	-0,1057
Dia 3 – Curva 1	0,9928	0,1759	0,0283
Dia 3 – Curva 2	0,9983	0,1494	0,0792
Dia 3 – Curva 3	0,9951	0,1690	0,0461
Dia 4 – Curva 1	0,9933	0,9933	-0,1203
Dia 4 – Curva 2	0,9941	0,1866	-0,0566
Dia 4 – Curva 3	0,9894	0,1824	-0,0221
Média	0,9934	0,1780	-
Desvio padrão	0,0044	0,0121	-
RSD (%)	0,44	6,78	-

Já a Tabela 22, abaixo, apresenta os resultados de recuperação *intraday* para esta mesma proposta.

Tabela 22: Resultados dos testes de recuperação das curvas analíticas externas em MISER com o ponto 6 ppm de cada curva de calibração adotado como OPIS.

Descrição	Recuperação (%)				
	2 ppm	4 ppm	6 ppm	8 ppm	10 ppm
Dia 1 – Curva 1	98,7	96,7	94,0	95,4	95,6
Dia 1 – Curva 2	101,6	99,0	95,9	105,6	105,3
Dia 2 – Curva 3	110,3	106,1	98,3	104,6	99,7
Dia 2 – Curva 1	102,9	96,8	95,1	111,5	102,4
Dia 2 – Curva 2	103,6	92,6	94,3	107,1	97,7
Dia 2 – Curva 3	113,9	101,8	92,9	100,1	95,3
Dia 3 – Curva 1	105,2	99,7	92,1	100,4	97,0
Dia 3 – Curva 2	108,5	112,7	102,7	114,1	116,3
Dia 3 – Curva 3	100,7	90,2	94,0	89,5	90,8
Dia 4 – Curva 1	131,6	114,0	102,9	113,5	104,3
Dia 4 – Curva 2	88,9	82,5	94,4	89,1	95,8
Dia 4 – Curva 3	104,6	96,3	93,4	98,8	103,0
Média	105,9	99,0	95,8	102,5	100,3
Desvio padrão	10,2	8,94	3,61	8,50	6,64
RSD (%)	9,67	9,03	3,77	8,29	6,62

A comparação desta última proposta com as demais estratégias foi realizada em termos de recuperação *intraday* dos valores da Tabela 22 com aqueles apresentados nas Tabelas 9, 11, 16 e 17 através do mesmo teste *t* anteriormente utilizado. Desta forma esta estratégia pode ser

considerada estatisticamente igual às demais em termos de recuperação *intraday* onde, para cada par de testes t , obteve-se valores de t calculados (0,13; -0,06; -0,41; 0,38) menores do que o valor crítico (1,98). Realizou-se também, de modo análogo ao anteriormente apresentado, o teste de recuperação *interday*. Para tal, a mesma solução da amostra a 6 ppm foi injetada e recuperada em cada umas das quatro curvas de calibração médias diárias, apresentando resultados iguais a 94,9% de recuperação na curva média do primeiro dia, 93,0% para o segundo dia, 94,8% para o terceiro dia e 95,8% para o quarto dia. Mais uma vez o teste t foi então utilizado para verificação da similaridade estatística com as demais técnicas envolvendo calibração interna, agora na recuperação *interday*, sendo que esta proposta pode ser considerada estatisticamente igual às demais, onde os valores de t calculados, iguais a 0,67 e -1,08 não ultrapassam o t crítico – igual a 2,45 – ficando consolidada uma terceira alternativa à construção de curvas de calibração por injeções múltiplas onde, mais uma vez, o OPIS acaba por ser um dos próprios pontos da curva de calibração ao invés de uma injeção adicional.

Com a relação sinal-ruído igual a 252 no ponto mais baixo, ou seja, 2 ppm, calculou-se o LOQ e o LOD aproximado do método. Para tal, utilizou-se a anteriormente apresentada Equação 5. Os resultados foram, respectivamente, iguais a 0,080 ppm e 0,024 ppm.

Contudo, os limites de quantificação e de detecção não são de todo importantes para a desejada aplicação em controle de qualidade. Isto é decorrido do fato das formulações farmacêuticas apresentarem teores muito mais altos dos respectivos princípios ativos do que os limites acima apresentados. Com um doseamento aproximado de 10 mg.g^{-1} em cremes, 300 mg em cápsula ou ainda 150 mg.mL^{-1} em injetáveis de clindamicina, estas amostras precisariam ser diluídas em torno de 25.000 vezes para que a solução injetada ficasse dentro da faixa de aplicação. A vantagem desta etapa de diluição está no *clean-up* de excipientes e sais contidos nestas matrizes, tornando a solução da amostra praticamente isenta de interferentes.

5.5 Frequência analítica

Pela análise dos cromatogramas e misergramas anteriormente apresentados fica o menor tempo de análise para construção das curvas analíticas aquelas realizadas por MISER. A Tabela 21 apresenta, para cada estratégia de calibração, o tempo de corrida, o número de picos eluídos em cada uma e a frequência analítica representada na forma de picos por minuto.

Tabela 23: Tempo total de análise necessário para construção das 12 curvas analíticas por cada uma das estratégias apresentadas.

Descrição	*Tempo corrida (min)	**Picos analíticos por corrida	Frequência (* picos analíticos por minuto)
Simples	1+1,4	1	0,417
Simples + OPIS	1+1,6	1	0,385
MISER	1+2,5	5	1,429
MISER + OPIS	1+3,0	5	1,250

*Refere-se ao tempo de condicionamento prévio, igual a 1 minuto, mais o tempo de análise.

**Desconsiderando o pico do OPIS.

Observando os valores é intuitiva a conclusão de que as estratégias envolvendo MISER apresentam frequência analítica consideravelmente superior às convencionais. Pelo fato de duas delas apresentarem padronização interna e, portanto, a necessidade da eluição de um pico adicional intrínseco da calibração, não seria justo compará-las àquelas que não a utilizam. Assim, portanto, enquanto o método convencional de calibração externa apresenta eluição média de 0,42 picos por minuto, sua imediata construída por MISER é aproximadamente 3,4 vezes mais ágil, com eluição média de 1,43 picos por minuto. Comparando as técnicas de padronização interna, novamente o método por MISER supera a convencional em 3,2 vezes.

A mesma proporção pode ser utilizada para avaliação do consumo de solvente. No fluxo de $400 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, enquanto os métodos convencionais gastariam em torno de 1 mL de fase móvel por pico eluído, com o mesmo volume a MISER permitiu a eluição de pouco mais de três picos. Por mais que em pequena escala esta diferença pareça insignificante, para equipamentos de uso contínuo o gasto com solventes e a geração de resíduos são também reduzidos em mesma proporção.

Aplicando esses números à realidade de uma indústria que possua um HPLC para controle de qualidade operando 24 horas por dia,

cada dia de trabalho teria a produtividade aproximada de três dias, utilizando também três vezes menos solventes e gerando três vezes menos resíduos.

6. Conclusões

Foi desenvolvido um único método em LC-ESI-MS/MS capaz de separar cloridrato de clindamicina, eritromicina estolato e azitromicina. Embora não houvesse necessidade de separação dos três antibióticos por eles não coexistirem em uma mesma formulação, as melhores condições atingidas não apresentaram coeluição. A separação obtida é promissora para a busca por contaminações cruzadas ou adulteração durante a fabricação e manipulação de medicamentos. A separação cromatográfica também abre portas para aplicação do método em análises ambientais.

No método desenvolvido, a técnica de injeções múltiplas foi aplicada com sucesso, para determinação de clindamicina. Com isso, tirou-se proveito da aplicação de MISER para a construção de curvas analíticas completas em um único gráfico: o misergrama. As curvas analíticas preparadas por MISER foram comprovadas estatisticamente iguais àquelas construídas por meios convencionais. A técnica de injeções múltiplas permite ainda a análise sequencial de um número de amostras limitado apenas pela capacidade do amostrador automático do equipamento.

As injeções múltiplas também possibilitaram a apresentação de uma nova versão de padronização interna, o *padrão interno em plugue externo*, ou OPIS. Portanto, esta proposta permite que o pico do analito seja padronizado com uma injeção adicional de uma solução padrão dele mesmo. Uma vez conhecido o erro associado à injeção, o OPIS demonstrou-se eficaz na correção de variações espectrais. Apesar de não ter sido comparado com um padrão interno convencional, as curvas analíticas padronizadas com OPIS inserido por injeções múltiplas demonstraram-se eficientes. A comparação entre as inclinações das regressões lineares das curvas plotadas deixou evidente a necessidade do uso de padronização interna, principalmente em análises *interday*.

Em adição às quatro estratégias de calibração apresentadas e comparadas uma quinta possibilidade foi levantada, sendo esta também comparada e considerada estatisticamente igual às demais em termos de recuperação *intraday* e *interday*, apresentando a vantagem de reduzir o tempo de análise tirando proveito do uso do OPIS sem a necessidade de uma injeção adicional para o mesmo.

A MISER, além de diminuir em no mínimo cinco vezes o número de cromatogramas encaminhados para o tratamento dos dados (um para cada ponto da curva analítica), provou também reduzir significativamente

o consumo de solventes, a geração de resíduos e o tempo total de análise, aumentando a frequência analítica em mais de três vezes.

Por fim, apesar testadas apenas à quantificação da clindamicina, há fundamentos para que as aqui propostas estratégias de calibração funcionem também com a eritromicina, com a azitromicina ou com qualquer outro analito, desde que o modo de eluição do método cromatográfico alvo das injeções múltiplas ou OPIS seja isocrático, incluindo, desde que não sejam modificados, os métodos farmacopéicos, para aplicações em controle de qualidade que não possam utilizar métodos desenvolvidos por terceiros.

7. Referências

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC n° 134 de 13 de julho de 2001.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE n° 899 de 29 de maio de 2003.

ARIKAWA, Y. Basic Education in Analytical Chemistry. **Analytical Sciences**. 17, i571-i573. 2001

BARCELÓ, D., PETROVIC, M. Challenges and Achievements of LC-MS in Environmental Analysis: 25 Years On. **Trends in Analytical Chemistry**. 26, 1, 2-11. 2007.

BARROS, B. N.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Química Nova. 25, 856. 2002.

BARROS, B. N.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria. **Editora da Unicamp**. 2001.

BERG, R. G.; MURTA, A. L. M.; KUGLER, W. O Método das Adições Padrão Aplicado à Análise Cromatográfica Quantitativa de Fenóis em Águas Residuais. **Química Nova**. 11, 288. 1988.

CHEN, H., ZHANG, Z., MCNULTY, C., OLBERT, C., YOON, H. J., LEE, J. W., KIM, S. C., SEO, M. W., OH, H. S., LEMMO, A. V., ELLIS, S. J., HEIMLICH, K. A High-throughput Combinatorial Approach for the Discovery of a Cremophor EL-free Paclitaxel Formulation. **Pharm. Res**. 20, 1302–1308. 2003.

CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J. **Química Nova**. 24, 374. 2001.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia. Editora Unicamp. 2006.

CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; GÁMIZ-GRACIA, L.; ALMANSA-LÓPEZ, E. M.; BOSQUE-SENDRA, J. M.; **Trends Anal. Chem.** 20, 620. 2001.

CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; GARCIA-CAMPAÑA, A. M.; ALMANSA-LÓPEZ, E. M.; EGEA-GONZÁLEZ, F. J.; CANO, M. L. C.; FRENICH, A. G.; MARTINEZ-VIDAL, J. L.; **Anal. Chim. Acta.** 478, 281. 2003.

CYPES, S.; CIZERON, J.; HAGEMEYER, A.; VOLPE, A. *Handbook of Green Chemistry: Green Catal.* 2, 247–280. 2009

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos.* DOQ-CGCRE-008. 2007.

International Conference on Harmonisation (ICH). *Validation of Analytical Procedures: Methodology.* Q2B (CPMP/ICH/281/95). 1995.

JANK, L., MARTINS, M. T., ARSAND, J. B., MOTTA, T. M. C., HOFF, R. B., BARRETO, F., PIZZOLATO, T. M. High-throughput Method for Macrolides and Lincosamides Antibiotics Residues Analysis in Milk and Muscle Using liquid-liquid extraction technique and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis (LC-MS/MS). **Talanta.** 144. 686-695. 2015.

JOHNSTONE, R.A.W., ROSE, M.E. *Mass Spectrometry for Chemists and Biochemists.* Cambridge University Press: Cambridge, Cap. 7. 1996.

KATO, K., JINGU, S., OGAWA, N., HIGUCHI, S.J. Determination of Pibutidine Metabolites in Human Plasmaby LC-MS/MS. **Pharm. Biomed. Anal.** 24: 237. 2000.

KRULL, I.; SWARTZ M. Quantitation in Method Validation. **LC-GC.** 16, 1084. 1998.

MICKE, G. A., COSTA, A. C. O., HELLER, M., BARCELLOS, M., PIOVEZAN, M., CAON, T., DE OLIVEIRA, M. A. L. Development of a fast capillary electrophoresis method for the determination of propranolol — Total analysis time reduction strategies. **Journal of Chromatography**. 1216, 7957-7961. 2009.

PAPP, R., ANDERSSON, U., CANTIN, L. D. Evaluating MISER Chromatography for a Rapid Formulation Screen. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 77, 94-99. 2013.

RIBANI, M., BOTTOLI, C., COLLINS, C., JARDIM, I., MELO, L. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27, n. 5, 771 – 780. 2004.

SIEGLE, A. F., TRAPP, O. Improving the Signal to Noise Ratio in Gel Permeation Chromatography by Hadamard Encoding. **Journal of Chromatography A**. 1448, 93-97. 2016.

SIEGLE, A. F., TRAPP, O. Development of a Straightforward and Robust Technique to Implement Hadamard Encoded Multiplexing to High Performance Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**. 86, 10828-10833. 2014.

SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., WEST, D. M., CROUCH, S. R. Fundamentals of Analytical Chemistry. 8^a Edição. Cengage Learning. 2009.

SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. Principles of Instrumental Analysis. 6^a Edição. Cengage Learning. 2007.

SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J., GLAJCH, J. L. Practical HPLC Method Development, 2^a Edição. Wiley: New York. Cap. 15. 1997.

STOKVIS, E., ROSING, H., BEIJNEN, J.H. Stable Isotopically Labeled Internal Standards in Quantitative Bioanalysis Using Liquid Chromatography/Mass Spectrometry: Necessity or Not? **Rapid Commun. Mass Spectrom.** 19, 401–407. 2005.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. **Pharm. Technol.** 2, 12. 1998.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single-laboratory Validation of Methods of Analysis. **Pure Appl. Chem.** 2002, 74. 835.

TISELIUS, A. The Moving-boundary Method of Studying the Electrophoresis of Proteins. **Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Upsaliensis**. Ser. IV, Vol. 7 (4). 1930.

TRAPP, O. Investigation of Modulation Parameters in Multiplexing Gas Chromatography. **Journal of Chromatography A.** 1217, 6640-6645. 2010.

TSWETT, M. On a New Category of Adsorption Phenomena and on it's Application to Biochemical Analysis. **Trudy Varhavskago Obshchestvaestevoispytatelei Otd Biol (Tr Warszawsk Obst Jestesv Otd Biol)**. 14: 20-39. 1903.

United States Pharmacopeia Convention. Validation of Compendial Methods. **US Pharmacopeia (USP) 24**, <1225>.

United States Pharmacopeia Convention. Chromatography. **US Pharmacopeia (USP) 29**, <621>.

VISTUBA, J. P., PIOVEZAN, M., PIZZOLATTI, M. G., REBELO, A. M., AZEVEDO, M. S., VITALI, L., COSTA, A. C. O., MICKE, G. A. 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.** 1274, 159-164. 2013.

VITALI, L., FÁVERE, V. T., MICKE, G. A. A New Method to Determine Biological Sample Volume by Short End Multiple Injection Capillary Electrophoresis: Application in Determination of Nitrate and Thiocyanate in Human Saliva. **Journal of Chromatography A.** 1281, 2327-2333. 2011a.

VITALI, L., HORST, B. L., HELLER, M., FÁVERE, V. T., MICKE, G. A. Using Multiple Short-end Injections to Develop Fast Electrophoretic Separations — Applications in Iodide Analysis. **Journal of Chromatography A**. 1218, 4586-4591. 2011.

WEBSTER, D. C. **Macromol. Chem. Phys.**209, 237–246. 2008.

WANG, P. G. High-Throughput Analysis in the Pharmaceutical Industry. **CRC Press**. 2009.

WELCH, C. J., GONG, X., SCHAFFER, W., PRATT, E. C., BRKOVIC, T., PIRZADA, Z., CUFF, J. F., KOSJEK, B. MISER Chromatography (multiple injection in a single experimental run): The Chromatograph is the Graph. **Tetrahedron: Asymmetry**. 21, 1674 – 1681. 2010.

WIELING, J. LC-MS-MS Experiences with Internal Standard. **Chromatographia**. 55: S107. 2002.

ZAWATZKY, K., BIBA, M., REGALADO, E. L., WELCH, C. J. MISER Chiral Supercritical Fluid Chromatography for High Throughput Analysis of Enantiopurity. **Journal of Chromatography A**. 1429, 374-379. 2016.