UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Avaliação de técnicas de microextração e eletroforese capilar em meio não aquoso (NACE) para determinação de antidepressivos em amostras de plasmas para fins de monitorização terapêutica

Ana Paula Formenton Catai

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Química

- RIBEIRÃO PRETO – SP
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Avaliação de técnicas de microextração e eletroforese capilar em meio não aquoso (NACE) para determinação de antidepressivos em amostras de plasmas para fins de monitorização terapêutica

Ana Paula Formenton Catai

Orientadora: Profa. Dra. Maria Eugênia Queiroz Nassur

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Química

- RIBEIRÃO PRETO – SP
2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catai, Ana Paula Formenton

Avaliação de técnicas de microextração e eletroforese capilar em meio não aquoso (NACE) para determinação de antidepressivos em amostras de plasmas para fins de monitorização terapêutica.

164 p.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientadora: Nassur, Maria Eugênia Queiroz

1. Extração sortiva em barra de agitação. 2. Microextração em sorvente empacotado. 3. Eletroforese capilar em meio não aquoso. 4. Antidepressivos. 5. Plasma humano.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Paula Formenton Catai

Avaliação de técnicas de microextração e eletroforese capilar em meio não aquoso (NACE) para determinação de antidepressivos em amostras de plasmas para fins de monitorização terapêutica

Tese apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Química

Aprovada em: ____/____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr_____

Instituição _____Assinatura_____

Prof. Dr_____

Instituição _____Assinatura_____

Prof. Dr_____

Instituição _____Assinatura_____

Prof. Dr_____

Instituição _____Assinatura_____

Prof. Dr_____

Instituição _____Assinatura_____

Dedicatória

A Deus que na sua grandeza não se esqueceu de mim.

Agradecimentos

À Deus, por ter me dado o privilégio de viver.

Ao Jonatan pelo amor, paciência e compreensão.

À Ana Vitória, uma benção enviada por Deus.

Aos meus pais, Benedita e Benedito, pelo amor e cuidado em todos os momentos de minha vida.

À minha irmã, Cláudia e cunhado, Petrus pelo incentivo.

À profª. Maria Eugênia Queiroz Nassur pela oportunidade de realizar este trabalho, colaborando com sua experiência e orientação.

Ao prof. Emanuel Carrilho por colaborar com minha formação.

Ao prof. Fernando Mauro Lanças por ter me dado a oportunidade de realizar uma parte dos experimentos em seu laboratório.

Ao prof. Nilson pela disposição em me ajudar nos experimentos com FIA.

Ao Flávio Pichelli pela amizade e colaboração.

À Odete e Elaine pela colaboração no desenvolvimento do meu trabalho.

À Lâmia, por ter sido paciente e prestativa em todos os momentos.

Aos amigos do laboratório e em especial à Andrea pelo apoio, amizade e compreensão.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A FAPESP pela bolsa concedida, processo no. 06/04633-4 .

RESUMO

A monitorização terapêutica tem sido descrita como um recurso clínico valioso, na individualização do regime de dosagem, de acordo com a concentração do fármaco em amostras de plasma ou soro. O objetivo da monitorização terapêutica é assegurar a eficácia clínica e minimizar os efeitos adversos dos fármacos prescritos na clínica. A química analítica moderna tem sido direcionada para a simplificação dos métodos através da miniaturização dos sistemas analíticos, minimização do consumo de solvente orgânico e do volume da amostra. Neste contexto, metodologias analíticas utilizando as técnicas de microextração, extração sortiva em barra de agitação (SBSE) e microextração em sorvente empacotado (MEPS), juntamente com a eletroforese capilar em solução não-aquosa (NACE) foram desenvolvidas para fins monitorização terapêutica de antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs: fluoxetina, sertralina, paroxetina e citalopram) em amostras de plasma de pacientes em terapia com ISRSs. Inicialmente foram padronizadas as condições eletroforéticas com detecção espectrofotométrica (UV) para análise simultânea dos ISRSs em amostras de plasma. Dentre as condições avaliadas (diferentes soluções de eletrólitos em meio aquoso e não aquoso, cromatografia eletrocinética micelar e NACE), a técnica NACE-UV foi a única que apresentou resolução dos fármacos adequada. Em seguida, otimizou-se as variáveis inerentes das técnicas de microextração (SBSE e MEPS), visando minimizar o tempo de análise e aumento da sensibilidade analítica. Para o método SBSE/NACE, as variáveis tempo e temperatura de extração, pH da amostra biológica e processo de

dessorção foram otimizadas, já para o método MEPS/NACE, as variáveis, pH da amostra biológica, volume da amostra e número dos ciclos aspirar/dispensar foram otimizadas. A validação analítica foi realizada segundo as normas preconizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com adição de padrão de padrão interno às amostras de plasma enriquecidas com os antidepressivos em diferentes concentrações plasmáticas que contemplam o intervalo terapêutico dos ISRSs. Para avaliar a aplicabilidade das metodologias padronizadas, amostras de plasma de pacientes em terapia com os ISRSs foram analisadas. Os métodos padronizados (SBSE/NACE e MEPS/NACE) foram comparados ao método de referência (LLE/NACE), utilizando a extração líquido-líquido. As técnicas de microextração, quando comparadas à LLE, apresentaram as seguintes vantagens: a reutilização das fases extratoras, procedimentos de extração com reduzido número de etapas, menores volumes de amostras biológicas e de solventes orgânicos. Segundo os parâmetros de validação avaliados, os métodos SBSE/NACE e MEPS/NACE padronizados podem ser empregados nas análises dos antidepressivos (ISRSs) em amostras de plasma, para fins de monitorização terapêutica.

Palavras-chave: Extração sortiva em barra de agitação, microextração em sorvente empacotado, eletroforese capilar em meio não aquoso. antidepressivos, plasma humano.

ABSTRACT

Therapeutic monitoring allows individualization of the dose regimen and has been indicated for the monitoring of well-established therapeutic intervals. In psychiatric disorders, most of the patients require that the plasmatic concentrations to be within a fixed range, so the disorders are kept under control and the adverse effects are acceptable. The aim of the therapeutic monitoring is ensure clinical effectiveness and minimization of adverse effects of drugs prescribed at the clinic. New trends in analytical chemistry have been directed towards simplification and miniaturization of analytical systems, and minimization of organic solvents and sample volume. In this work, analytical methodologies using microextraction techniques, such as stir bar sorptive extraction (SBSE) and microextraction by packed sorbent (MEPS), in conjunction with capillary electrophoresis in a nonaqueous background electrolyte (NACE) were developed for therapeutic drug monitoring of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs: fluoxetine, sertraline, paroxetine and citalopram) in plasma sample of patients in therapy with SSRIs. First, the optimization of electrophoretic separation of the SSRIs was carried out to obtain simultaneous analysis of all antidepressants. Among the conditions evaluated (different background electrolytes in aqueous and nonaqueous medium, micellar electrokinetic capillary chromatography, and NACE), NACE-UV gave the best results. In the sequence, the optimization of the inherent variables of microextraction techniques (SBSE and MEPS)—aiming analyses time minimization and increase of analytical sensibility—was carried out. For SBSE/NACE methodology development the variables such as time of

extraction, temperature of extraction, and matrix pH were optimized. For MEPS/NACE methodology the variables matrix pH and the volume of draw-eject cycles were optimized. Analytical validation was carried out in agreement with the norms of National Health Surveillance Agency (ANVISA) for both of the proposed methods, in different plasmatic concentrations, which completed the therapeutic interval. The developed methods (SBSE/NACE e MEPS/NACE) were compared to the reference method, using liquid-liquid extraction (LLE/NACE). Microextraction techniques, compared to LLE, gave the following advantages: reutilization of the extraction phase, fewer numbers of steps for extraction, reduction of sample volume, and less consumption of organic solvents. According to the evaluated validation parameters, the standardized methods SBSE/NACE and MEPS/NACE can be used in the analyses of antidepressants (SSRIs) in plasma sample for therapeutic drug monitoring purposes.

Key Words: stir bar sorptive extraction, solid-phase microextraction, antidepressants, nonaqueous capillary electrophoresis, plasma sample.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação estrutural dos antidepressivos (ISRSs) estudados. . 30

Figura 2. Representação estrutural da mirtazapina. 31

Figura 3. Ilustração da barra de agitação magnética com o recobrimento de PDMS..... 37

Figura 4. Estrutua do oligômero de PDMS (n=60). 38

Figura 5. Microsseringa MEPS (250 μL) e microcoluna com material sorvente empacotado 48

Figura 6. Ilustração das etapas envolvidas na microextração (MEPS) 49

Figura 7. Representação esquemática de um sistema de eletroforese capilar 54

Figura 8. Representação do fluxo eletroosmótico formado no capilar [101]. 55

Figura 9. Esquema das etapas da LLE dos antidepressivos do plasma..... 73

Figura 10. Eletroferogramas obtidos da análise dos antidepressivos em: A) tampão fosfato de sódio; B) tampão acetato de amônio; C) tampão acetato de sódio e D) tampão formiato de sódio. 86

Figura 11. Eletroferograma obtido da análise dos antidepressivos em solução tampão formiato de amônio 50 mM em pH 2,9. Tempo de injeção 2 s a 6,9 mbar e campo elétrico de 300 V/cm. Ordem de migração dos antidepressivos: 1º) sertralina; 2º) paroxetina; 3º) fluoxetina e 4º) citalopram. 87

Figura 12. Eletroferogramas dos antidepressivos analisados separadamente em solução tampão formiato de amônio 50 mM pH 2,9. Tempo de injeção 2 s a 6,9 mbar e campo elétrico de 300 V/cm..... 88

Figura 13. Resolução eletroforética dos fármacos em solução tampão formiato de amônio 50 mM em diferentes valores de pH (2,7 a 4,1). R1 corresponde à resolução entre os picos 1(sertralina) e 2 (paroxetina); R2 corresponde à resolução entre os picos 2 (paroxetina) e 3(fluoxetina); e R3 corresponde à resolução entre os picos 3(fluoxetina) e 4 (citalopram). 89
Figura 14. Valores de resolução para as separações dos fármacos em solução tampão formiato de amônio pH 2,9 em diferentes concentrações (20 a 100 mM). R1 corresponde à resolução entre os picos 1(sertralina) e 2 (paroxetina); R2 corresponde à resolução entre os picos 2 (paroxetina) e 3(fluoxetina); e R3 corresponde à resolução entre os picos 3(fluoxetina) e 4. (citalopram). 90
Figura 15. Eletroferograma obtido em solução tampão formiato de amônio 40 mM em pH 2,0. Tempo de injeção 2 s a 6,9 mbar e campo elétrico de 300 V/cm. Ordem de migração dos antidepressivos: 1º) sertralina; 2º) paroxetina; 3º) fluoxetina e 4º) citalopram. 91
Figura 16. Eletroferograma da análise MEKC dos quatro antidepressivos utilizando-se o eletrólito fosfato de sódio 25 mM pH 7,5, dodecil sulfato de sódio 20 mM e 30% de metanol. Condições de análise tempo de injeção 10 segundos a 6,9 mbar e campo elétrico de 387,6 V/cm com polaridade inversa. Pico 1 corresponde ao citalopram e paroxetina; pico 2 corresponde à fluoxetina e sertralina. 92
Figura 17. Eletroferograma da análise NACE dos quatro antidepressivos em meio não aquoso. Condições: 100 mM acetato de amônio, 2 M ácido acético em acetonitrila; tempo de injeção 2s a 6,9 mbar, campo elétrico 478 V/cm. (1) sertralina; (2) fluoxetina; (3) citalopram e (4) paroxetina. 94

Figura 18. Eletroferogramas obtidos nas análises dos antidepressivos em diferentes concentrações de ácido fosfórico em acetonitrila. Condições de análise: injeção 10 s a 6,9 mbar; campo elétrico 300 V cm-1. Ordem de migração dos antidepressivos: 1º) sertralina; 2º) fluoxetina; 3º) citalopram e 4º) paroxetina. 96

Figura 19. Eletroferogramas obtidos da análise dos quatro antidepressivos em meio não-aquoso de ácido fosfórico 1,25 mol L^{-1} em acetonitrila variando-se o campo elétrico: A) 300 V/cm; B) 400 V/cm; C) 500 V/cm e D) 600 V/cm. Condições de análise: injeção 10 s a 6,9 mbar. Ordem de migração dos antidepressivos: 1º) sertralina; 2º) fluoxetina; 3º) citalopram e 4º) paroxetina. 97

Figura 20. Gráfico de Ohm obtido para a solução de ácido fosfórico (1,25 mol L^{-1})..... 98

Figura 21. Eletroferogramas LLE/NACE. A) amostra de plasma branco de referência enriquecida com os fármacos na concentração de 500 ng mL^{-1}. B) amostra de plasma branco de referência. (1) Sertralina, (2) fluoxetina, (3) citalopram, (4) paroxetina e (5) mirtazapina, como padrão interno. Condições de análise: injeção 10 s a 6,9 mbar; campo elétrico 500 V cm^{-1}, eletrólito de separação: ácido fosfórico 1,25 mol L^{-1} em acetonitrila. 100

Figura 22. Eletroferogramas LLE/NACE de amostras de plasma de pacientes em terapia com os antidepressivos. Concentrações determinadas A) (1) Sertralina (215 ng mL^{-1}); B) (2) fluoxetina (22 ng mL^{-1}); C) (3) citalopram (284 ng mL^{-1}); D) (4) paroxetina (313 ng mL^{-1}) e (5) padrão interno. Condições de análise: injeção 10 s a 6,9 mbar; campo elétrico 500 V cm^{-1}, eletrólito de separação: ácido fosfórico 1,25 mol L^{-1} em acetonitrila. 104

Figura 23. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para o antidepressivo sertralina. A amostra de plasma foi enriquecida com o antidepressivo (500 ng mL^{-1}) e diluída com solução tampão borato 0,05 mol L^{-1} pH 9,0. Condições eletroforéticas: eletrólito de separação 1,25 M de ácido fosfórico em acetonitrila; campo elétrico de 500 V cm^{-1}; injeção hidrodinâmica por 10 s 6,9 mbar. 107
Figura 24. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para o antidepressivo paroxetina. A amostra de plasma foi enriquecida com o antidepressivo (500 ng mL^{-1}) e diluída com solução tampão borato 0,05 mol L^{-1} pH 9,0. Condições eletroforéticas: eletrólito de separação 1,25 M de ácido fosfórico em acetonitrila; campo elétrico de 500 V cm^{-1}; injeção hidrodinâmica por 10 s a 6,9 mbar. 108
Figura 25. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para o antidepressivo fluoxetina. A amostra de plasma foi enriquecida com o antidepressivo (500 ng mL^{-1}) e diluída com solução tampão borato 0,05 mol L^{-1} pH 9,0. Condições eletroforéticas: eletrólito de separação 1,25 M de ácido fosfórico em acetonitrila; campo elétrico de 500 V cm^{-1}; injeção hidrodinâmica por 10 s a 6,9 mbar. 109
Figura 26. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para o antidepressivo citalopram. A amostra de plasma foi enriquecida com o antidepressivo (500 ng mL^{-1}) e diluída com solução tampão borato 0,05 mol L^{-1} pH 9,0. Condições eletroforéticas: eletrólito de separação 1,25 M de ácido fosfórico em acetonitrila; campo elétrico de 500 V cm^{-1}; injeção hidrodinâmica por 10 s a 6,9 mbar. 110

Figura 27. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para o antidepressivo mirtazapina. A amostra de plasma foi enriquecida com o antidepressivo (500 ng mL^{-1}) e diluída com solução tampão borato 0,05 mol L^{-1} pH 9,0. Condições eletroforéticas: eletrólito de separação 1,25 M de ácido fosfórico em acetonitrila; campo elétrico de 500 V cm^{-1}; injeção hidrodinâmica por 10 s a 6,9 mbar. 111

Figura 28. Influência do pH da matriz na eficiência do processo de extração em barra (SBSE). Amostra enriquecida com antidepressivos na concentração de 500 ng mL^{-1}. Condições eletroforéticas: eletrólito de separação 1,25 M de ácido fosfórico em acetonitrila; campo elétrico de 500 V cm^{-1}; injeção hidrodinâmica por 10 s a 6,9 mbar. 114

Figura 29. Influência do tempo de dessorção na eficiência do processo SBSE de extração em barra. Amostra enriquecida com antidepressivos na concentração de 500 ng mL^{-1}. Condições eletroforéticas: eletrólito de separação 1,25 M de ácido fosfórico em acetonitrila; campo elétrico de 500 V cm^{-1}; injeção hidrodinâmica por 10 s a 6,9 mbar..... 115

Figura 30. Eletroferograma referente à análise SBSE/NACE da amostra de plasma branco de referência. Condições SBSE: 4 mL de solução tampão borato pH 9,0, a 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em acetonitrila/metanol (60:40, v/v) durante 45 minutos. Condições eletroforéticas: eletrólito de separação 1,25 M de ácido fosfórico em acetonitrila; campo elétrico de 500 V cm^{-1}; injeção hidrodinâmica por 10 s. 118

Figura 31. Eletroferograma referente à análise SBSE/NACE da amostra de plasma branco de referência enriquecido com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL^{-1}. Condições SBSE: 4 mL de solução tampão

borato pH 9,0, a 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em acetonitrila/metanol (60:40, v/v) durante 45 minutos. Condições eletroforéticas: eletrólito de separação 1,25 M de ácido fosfórico em acetonitrila; campo elétrico de 500 V cm^{-1}; injeção hidrodinâmica por 10 s a 6,9 mbar. A ordem de migração dos antidepressivos é 1) sertralina, 2) paroxetina, 3) fluoxetina, 4) citalopram e 5) mirtazapina. 119

Figura 32. Eletroferogramas referente à análise SBSE/NACE da amostra de plasma de paciente em terapia com os antidepressivos. Concentraçcões determinadas: A) (1) sertralina (223,5 ng mL^{-1}); B) (2) fluoxetina (32,0 ng mL^{-1}); C) (3) citalopram (241,3 ng mL^{-1}); D) (4) paroxetina (287,4 ng mL^{-1}) e (5) padrão interno. Condições de análise: injeção 10 s a 6,9 mbar; campo elétrico 500 V cm^{-1}, eletrólito de separação: ácido fosfórico 1,25 mol L^{-1} em acetonitrila. 124

Figura 33. Efeito do pH das amostras de plasma diluídas com solução tampão fosfato e borato. Ensaios realizados com 400 μL amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos (500 ng mL^{-1}) diluída com 400 μL de solução tampão e dessorção líquida dos analitos com 150 μL tampão fosfato 50 mmol L^{-1} pH 4,5 e metanol (v/v 55:45). 126

Figura 34. Efeito do volume da amostra diluída aspirar/dispensar na eficiência do processo MEPS. 127

Figura 35. Efeito dos ciclos aspirar/dispensar na influência do processo MEPS. Ensaios realizados com 250 μL de amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos (500 ng mL^{-1}) 128

Figura 36. Eletroferogramas MEPS/CE. A) amostra de plasma branco de referência enriquecida com os fármacos na concentração de 500 ng mL^{-1}. (1) Sertralina, (2) fluoxetina, (3) citalopram, (4) paroxetina e (5) mirtazapina, como

padrão interno. B) amostra de plasma de referência. Condições de análise:; campo elétrico 500 V cm^{-1}, eletrólito de separação: ácido fosfórico 1,25 mol L^{-1} em acetonitrila..... 130

Figura 37. Eletroferogramas MEPS/CE de amostras de plasma de pacientes em terapia com os antidepressivos. Concentrações determinadas A) (1) Sertralina (387,1 ng mL^{-1}); B) (2) fluoxetina (220,1 ng mL^{-1}); C) (3) citalopram (233,8 ng mL^{-1}); D) (4) paroxetina (403,5 ng mL^{-1}) e (5) mirtazapina (100 μg mL^{-1}). Condições de análise: injeção 10 s a 6,9 mbar; campo elétrico 500 V cm-1, eletrólito de separação: ácido fosfórico 1,25 mol L-1 em acetonitrila..... 133

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Aplicações da técnica SBSE para análise em fluídos biológicos. 45

Tabela 2. Aplicações da técnica MEPS para análise de fármacos e metabólitos em amostras biológicas. 51

Tabela 3. Aplicações da técnica NACE para análise de fármacos em amostras biológicas. 58

Tabela 4. Condições eletroforéticas em meio não-aquoso empregadas na análise dos antidepressivos. 71

Tabela 5. Condições eletroforéticas empregadas na análise dos antidepressivos. 79

Tabela 6. Valores de pKa e massas moleculares dos antidepressivos 84

Tabela 7. Parâmetros de validação analítica do método LLE/NACE padronizado para análise simultânea dos antidepressivos em amostras de plasma..... 102

Tabela 8. Precisão e exatidão do método LLE/NACE padronizado para a análise simultânea dos antidepressivos em amostras de plasma, n=5..... 103

Tabela 9. Linearidade e limite de quantificação do método SBSE/NACE..... 120

Tabela 10. Precisão inter ensaios, exatidão e recuperação relativa do método SBSE/NACE..... 122

Tabela 11. Linearidade e limite de quantificação (LOQ) do método MEPS/NACE para análise de antidepressivos em amostras de plasma..... 131

Tabela 12. Precisão inter ensaios, exatidão e recuperação absoluta do método MEPS/NACE. 132

Tabela 13. LOQ, exatidão, precisão interensaio (RSD %) e tempo de extração para as metodologias LLE/NACE, SBSE/NACE e MEPS/NACE para análises de antidepressivos (200 ng mL^{-1}) em amostras de plasma..... 135

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN acetonitrila

ADT antidepressivos tricíclicos

ANES antidepressivos noradrenérgicos e específicos serotoninérgicos

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CE eletroforese capilar

CV coeficiente de variação

CZE eletroforese capilar de zona

C8 octil

C18 octadecil

DAD detector de arranjo de diodo

GC cromatografia gasosa

IMAOs inibidores da monoamina oxidase

IRSNs inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina

ISRSs inibidores seletivos da recaptação de serotonina

LC cromatografia líquida

LD dessorção líquida

LLE extração líquido-líquido

LOD limite de detecção

LOQ limite de quantificação

MEKC cromatografia eletrocinética micelar

MeOH metanol

MEPS microextração em sorvente empacotado

MS espectrômetro de massa

NACE eletroforese capilar em meio não aquoso

NaSSA receptores noradrenérgicos e serotonérgicos

OMS Organização Mundial de Saúde

PDMS polidimetilsiloxano

SBSE extração sortiva em barra de agitação

SCX trocador forte de cátions

SPE extração em fase sólida

SPME microextração em fase sólida

TD dessorção térmica

UV ultravioleta

VIS visível

SUMÁRIO

1. Introdução 27

1.1 Antidepressivos 27
1.1.1 Inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs) 28
1.1.2 Receptores noradrenérgico e serotonérgico (NaSSa) 30
1.2 Monitorização terapêutica 31
1.3 Métodos analíticos 33
1.3.1 Extração sortiva em barra de agitação 36
1.3.1.1 Princípios teóricos da SBSE 37
1.3.1.2 Processo SBSE 41
1.3.1.3 Otimização do Processo SBSE 42
1.3.2 Análises quantitativas 43
1.3.3 Aplicações 44
1.3.4 Micro extração em sorvente empacotado 46
1.3.4.1 Processo MEPS para a determinação de fármacos em fluidos biológicos 48
1.3.5 Aplicações 50
1.4 Eletroforese Capilar (CE) 53
1.4.1 Aplicações 57
1.5 Validação Analítica 59
1.5.1 Linearidade 60
1.5.2 Precisão 61
1.5.3 Limite de detecção (LOD) 62
1.5.4 Limite de quantificação (LOQ) 62
1.5.5 Recuperação 63
1.5.6 Especificidade 63

2. Objetivos 65

3. Materiais e métodos 67

3.1. Determinação de antidepressivos ISRSs em amostras de plasma por extração líquido-líquido e eletroforese capilar em meio não aquoso (LLE/NACE) 67
3.1.1.Padrões analíticos e reagentes 67
3.1.2. Eletroforese capilar 68
3.1.3. Otimização da separação eletroforética 68
3.1.3.1. Avaliação de diferentes soluções de eletrólito em meio aquoso 68
3.1.3.2. Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) 69
3.1.3.3. Eletroforese capilar em meio não aquoso (NACE) 69
3.1.4. Amostras de plasma 71
3.1.5. Extração líquido-líquido 72
3.1.6 Validação analítica do método LLE/NACE-UV padronizado 74
3.1.6.1 Seletividade 74
3.1.6.2 Linearidade 74
3.1.6.3. Precisão 74

3.1.6.4 Limites de quantificação e detecção 75
3.1.6.5. Recuperação 76
3.1.6.6. Exatidão 77
3.2. Determinação de antidepressivos ISRSs em amostras de plasma por extração sortiva em barra de agitação e eletroforese capilar em meio não aquoso (SBSE/NACE) 78
3.2.1 Condicionamento SBSE 78
3.2.2. Condições eletroforéticas 78
3.2.3 Otimização do processo SBSE 79
3.2.4 Validação analítica do método SBSE/NACE-UV para análise simultânea de antidepressivos 80
3.3. Determinação de antidepressivos ISRSs em amostras de plasma por micro extração em sorvente empacotado e eletroforese capilar em meio não aquoso (MEPS/NACE) 81
3.3.1. Condições de análise MEPS/CE-UV 81
3.3.2. Pré-preparo da amostra biológica 81
3.3.3 Procedimento MEPS 81

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 84

4.1. Determinação de antidepressivos ISRSs em amostras de plasma por extração líquido-líquido e eletroforese capilar em meio não aquoso (LLE/NACE) 84
4.1.1. Otimização da separação eletroforética 84
4.1.1.1. Avaliação de diferentes soluções de eletrólito em meio aquoso 84
4.1.1.2. Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) 91
4.1.1.3. Eletroforese capilar em meio não aquoso (NACE) 93
4.1.2. Validação analítica do método LLE/NACE-UV para a determinação dos ISRSs em amostras de plasma 99
4.1.2.1 Seletividade 99
4.1.2.3 Linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e recuperação relativa 100
4.2 Determinação de antidepressivos ISRSs em amostras de plasma por extração sortiva em barra de agitação e eletroforese capilar em meio não aquoso (SBSE/NACE) 105
4.2.1 Padronização do método SBSE/NACE-UV para análise simultânea de antidepressivos 105
4.2.2 Otimização do tempo e da temperatura de extração 105
4.2.3 Influência do pH da amostra 112
4.2.4 Tempo de Dessorção 114
4.2.5 Validação analítica 117
4.2.5.1 Seletividade do método SBSE/NACE 117
4.2.5.2 Linearidade 120
4.2.5.3 Limite de Quantificação (LOQ) 120
4.2.5.4 Recuperação relativa, exatidão e precisão inter ensaio 121
4.2.5.5 Aplicabilidade do método SBSE/NACE 123
4.3. Determinação de antidepressivos ISRSs em amostras de plasma por micro extração em sorvente empacotado e eletroforese capilar em meio não aquoso (MEPS/NACE) 125

4.3.1 Padronização do método MEPS/NACE-UV para análise simultânea de antidepressivos 125
4.3.1.1 Otimização das variáveis da MEPS 125
4.3.2 Validação do método MEPS/NACE 129
4.3.3 Aplicação do método MEPS/NACE desenvolvido 133
4.4 Comparação entre as metodologias padronizadas 134

5. Conclusão 136

6. Referências 138

1. Introdução

1.1 Antidepressivos

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), de 13 a 20% da população mundial apresentam sintomas depressivos, sendo 2 a 3% desse total atribuídos a indivíduos com transtornos afetivos graves, dos quais 15 a 30% cometem suicídio ou são potenciais suicidas. Mesmo sob tratamento médico, 30% dos pacientes com diagnóstico depressivo não respondem à terapia farmacológica, devido ao tempo de latência associado ao surgimento dos efeitos terapêuticos e, ainda, aos seus efeitos adversos, os quais contribuem para o abandono da terapia [1].

Pesquisas indicam que de 50 % a 60 % dos casos de depressão não são diagnosticados pelo clínico e muitas vezes os pacientes não recebem tratamento adequado ou suficiente. Os motivos para o sub-diagnósticos são conseqüentes de vários fatores que estão relacionados aos pacientes e aos médicos, como por exemplo: preconceito dos pacientes em razão da doença, descrença do tratamento, falta de treinamento dos médicos que reconhecem apenas os sintomas físicos e consideram os sintomas como aceitáveis. Entretanto, com tratamento adequado, cerca de 70% da mobi-mortalidade associada à depressão pode ser prevenida [2, 3].

O tratamento farmacológico da depressão teve início no final da década de 50, com o desenvolvimento dos antidepressivos que foram classificados tradicionalmente em dois grupos: os antidepressivos tricíclicos (ADTs) e os

antidepressivos inibidores da monoamina oxidase (IMAO) [4]. Embora muito eficazes e ainda utilizados, estes compostos apresentam efeitos adversos indesejáveis causados pela inespecificidade de sua ação farmacológica e em casos de superdosagem, têm sido potencialmente letais.

Posteriormente, surgiram moléculas que não se enquadram em nenhum desses grupos: os antidepressivos não-tricíclicos e não-IMAO, também conhecidos como antidepressivos da segunda geração, ou antidepressivos atípicos, ou, ainda novos antidepressivos. Esses antidepressivos surgiram da pesquisa de moléculas desprovidas dos efeitos adversos dos clássicos ADTs e IMAOs[5]. Entre os antidepressivos da nova geração, podemos destacar os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs), os inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (IRSNs) e os noradrenérgicos e específicos serotoninérgicos (ANES) [3, 6].

1.1.1 Inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs)

O desenvolvimento de fármacos coincide com o aumento na prescrição de antidepressivos devido ao aumento do diagnóstico [7]. Assim sendo, os psiquiatras tem uma ampla gama de medicamentos que podem prescrever, dependendo das necessidades individuais de cada paciente, contudo todos os antidepressivos foram desenvolvidos baseados na teoria monoamino da depressão, a qual confere a deficiência biológica da monoamina à causa da depressão [8].

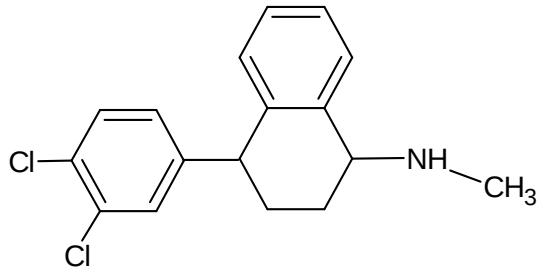
Os ISRSs são fármacos que tem substituído os antidepressivos tricíclicos e os inibidores da monoaminoxidase por apresentarem segurança e

tolerabilidade, além de aumentar a eficácia. O mecanismo de atuação confere classes distintas aos antidepressivos, contudo os mecanismos da depressão ainda não tenham sido totalmente estabelecidos. Os antidepressivos atualmente disponíveis atuam aumentando a atividade dos neurotransmissores por inibição da recaptaçao, ou inibição enzimática, ou na atividade dos receptores pré ou pós-sinápticos [8-11].

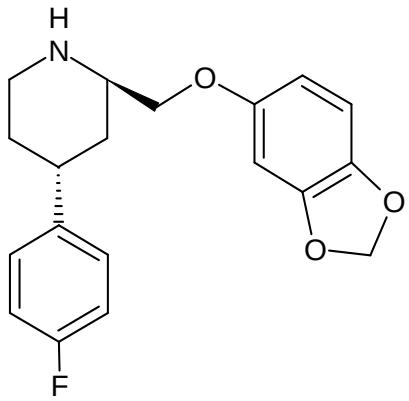
Os ISRSs incluem os seguintes antidepressivos: fluoxetina, paroxetina, citalopram e sertralina (Figura 1). Estes apresentam eficácia clínica semelhante aos clássicos ADTs, mas destituídos dos efeitos anticolinérgicos (boca seca, constipação, visão turva, retenção urinária e toxicidade cognitiva) e efeitos cardiovasculares (aumento do ritmo cardíaco e diminuição na condução cardíaca) [12].

Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina são considerados os primeiros antidepressivos altamente seletivos para o neurotransmissor monamino serotonina (5-HT) [8-11, 13-15]. Estes inibem de forma potente e seletiva a recaptação de serotonina, resultando em potencialização da neurotransmissão serotonérgica.

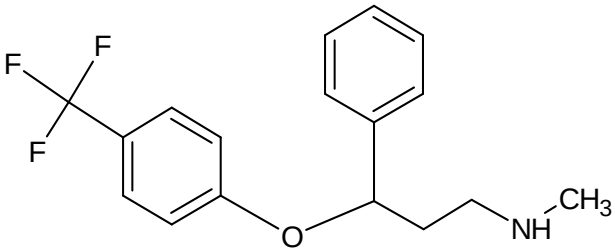
Os ISRSs são rapidamente absorvidos, ligam-se às proteínas plasmáticas (alta porcentagem), todos deslocam outros fármacos da ligação protéica, aumentando seu nível plasmático. Essas substâncias são metabolizadas primariamente pelo fígado, afetam as enzimas metabolizadoras do citocromo P-450 (em menor proporção, a sertralina) e podem comprometer o metabolismo de outros fármacos metabolizados por este sistema [8, 9, 13, 16-19].



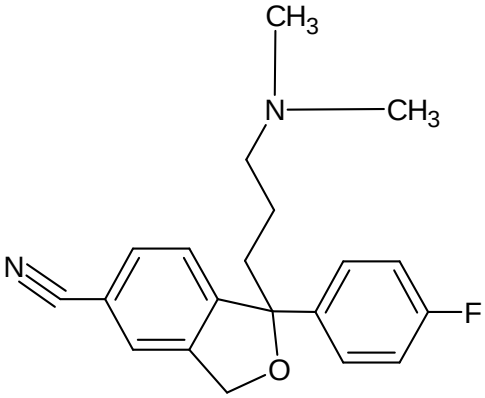
Sertraline



Paroxetine



Fluoxetine



Citalopram

Figura 1. Representação estrutural dos antidepressivos (ISRSs) estudados.

1.1.2 Receptores noradrenérgico e serotonérgico (NaSSa)

Esses fármacos tem a propriedade de fazer um bloqueio inibitório pré-sináptico dos α2-adrenoceptores, resultando em aumento do sinal sináptico, liberando serotonina e noradrenalina, e também age em vários receptores de

pós-sinápticos, inclusive o neurotransmissor monoamino serotonina. Os antidepressivos dessa categoria tendem a ter um efeito calmante [8].

A mirtazapina (Figura 2) é um antidepressivo noradrenérgico e serotonérgico seletivo, atuando no aumento de liberação sináptica da serotonina e noradrenalina através do bloqueio dos inibidores pré-sinápticos [8, 20-22].

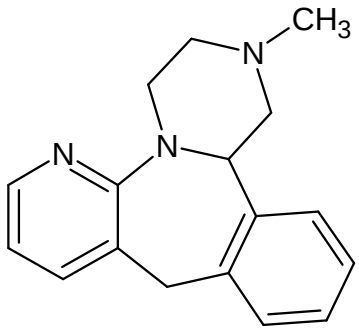


Figura 2. Representação estrutural da mirtazapina.

1.2 Monitorização terapêutica

Muitos fármacos estão disponíveis para o controle das desordens psiquiátricas, porém a eficácia clínica está diretamente ligada aos fatores fisiológicos e patológicos de cada paciente. A concentração plasmática de um determinado fármaco é dependente da biodisponibilidade e do *clearance* deste fármaco e, estes parâmentros são afetados por inúmeras variáveis, como a idade, sexo, fatores genéticos, *status* nutricional, interações farmacocinéticas com alimentos e outros fármacos [23]. Assim o ajuste de dosagem aumenta de maneira significativa o sucesso do tratamento, pois relaciona concentração plasmática e reposta clínica.

A monitorização terapêutica tem sido descrita como valioso recurso clínico, na individualização do regime de dosagem, de acordo com a concentração do fármaco e/ou de seus produtos de biotransformação em amostras de plasma ou soro, coletadas com base no contexto clínico e nos princípios da farmacocinética [24].

O objetivo da monitorização terapêutica é assegurar a eficácia e minimizar os efeitos adversos dos fármacos, prescritos na clínica. Os fármacos monitorados tem sido aqueles que apresentam intervalos terapêuticos bem estabelecidos, ou seja, a maioria dos pacientes, que apresentam concentrações plasmáticas dentro deste intervalo fixo, tem as desordens psiquiátricas mantidas sob controle e efeitos adversos aceitáveis. A monitorização terapêutica também tem sido aplicada a fármacos de baixo índice terapêutico, alta variabilidade interindividual na farmacocinética e resposta clínica não facilmente ou não imediatamente mensurável [25].

A aplicação clínica da monitorização terapêutica tem sido indicada em situações onde a eficácia do medicamento é questionada, quando o paciente exibe toxicidade provavelmente relacionada ao fármaco, quando há suspeita de não aderência do paciente ao regime de dosagem estabelecido, nas situações de interações de fármacos, nas patologias associadas capazes de alterar a disposição do fármaco, nas situações de mudanças na formulação ou ainda quando a condição do paciente é refratária ao regime de dosagem convencional [24].

As concentrações plasmáticas terapêuticas recomendadas tem sido de 100 a 500 ng mL^{-1} para fluoxetina, 50 a 500 ng mL^{-1} para a sertralina, 20 a 500 ng mL^{-1} para a paroxetina e 25 a 550 ng mL^{-1} para o citalopram [26].

Contudo, estes intervalos terapêuticos não estão claramente definidos, e pesquisas com os ISRSs indicam que as concentrações plasmáticas variam de 50 a 200 ng mL^{-1} [27].

O desenvolvimento de métodos analíticos seletivos e de alta sensibilidade analítica para a determinação de antidepressivos em fluidos biológicos tem sido requerido, tanto para monitorização terapêutica quanto para análises toxicológicas de urgência [8, 28-30].

1.3 Métodos analíticos

Em razão da complexidade da maioria das amostras, estas não podem ser introduzidas diretamente no sistema analítico, como por exemplo, no cromatográfico, no estado bruto, pois apresentam interferentes que podem coeluir com os solutos, durante a separação cromatográfica, ou adsorverem de forma irreversível junto à coluna analítica, modificando a retenção dos solutos e diminuindo o tempo de vida da coluna analítica.

O tratamento prévio de amostras biológicas que abrange as etapas de eliminação de interferentes (compostos endógenos ou outros fármacos administrados de forma concomitante com os solutos), extração e pré-concentração dos solutos, tem sido um procedimento indispensável e extremamente importante para o desenvolvimento de métodos de análise com sensibilidade e seletividade analítica adequados às análises de fármacos [31].

Os métodos convencionais empregados no preparo de amostras biológicas para análises de antidepressivos têm sido a extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE) [15, 22, 32- 39] .

A extração líquido-líquido é uma técnica simples e largamente empregada, onde dois líquidos imiscíveis em contanto representam duas fases [40]. Os analitos inicialmente solubilizados em uma das fases tendem a dissolverem-se em ambas as fases até que o equilíbrio de partição destes entre as fases seja atingido. Um movimento dinâmico a temperatura constante, as concentrações dos solutos nas soluções permanecem constantes. Nesse momento, se uma das fases for removida e substituída pela mesma fase pura e o sistema for deixado atingir o equilíbrio, as concentrações dos solutos, nas duas soluções serão diferentes, porém suas relações permanecerão constantes. Este valor constante é chamado de coeficiente de partição ou coeficiente de distribuição (K). Termodinamicamente, quando for atingido o equilíbrio, os potenciais químicos do soluto nas fases serão iguais [41, 42].

A técnica de extração líquido-líquido apresenta algumas desvantagens como consumo de solventes orgânicos de alta pureza, exposição do analista a solventes tóxicos, formação de emulsão entre as fases e várias etapas para sua execução, o que resulta na perda do analito. Porém, devido à simplicidade, ou seja, ausência de instrumentação sofisticada e ao grande número de metodologias descritas na literatura e com baixos limites de quantificação, a LLE tem sido considerada o método de referência [34, 43].

A extração em fase sólida apresenta uma grande variedade de fases extratoras resultando em diferentes tipos de interações com os analitos. Dessa forma, a seletividade analítica é favorecida, possibilitando a automação das análises e o acoplamento em linha com técnicas cromatográficas. Contudo, esta técnica tem apresentado algumas limitações, como o bloqueio dos poros da fase extratora pelos componentes da matriz biológica, a utilização de

solventes orgânicos para a eluição, variações analíticas entre os cartuchos extratores e várias etapas operacionais na execução da extração [43, 44,-46].

A química analítica moderna tem sido direcionada para a simplificação através da hifenação de técnicas, miniaturização dos sistemas analíticos, minimização do consumo de solvente orgânico e do volume da amostra. Neste contexto, podemos destacar as técnicas de microextração, microextração em fase sólida (SPME), extração sortiva em barra de agitação (SBSE) e microextração em sorvente empacotado (MEPS), as quais utilizam pequeno volume de solvente orgânico. Estas técnicas integram a extração e concentração do soluto em única etapa, reduzindo a perda do soluto e o tempo da análise.

A microextração é definida como técnica de preparo de amostra, onde o volume da fase extratora é bem menor quando comparado ao volume da amostra, apenas uma pequena fração do soluto presente na amostra é extraída. A extração é baseada no processo de partição (solubilidade) do soluto entre a fase aquosa (amostra) e a fase extratora. A extração não é um processo exaustivo, ou seja, quando o equilíbrio de partição do soluto entre as fases é atingido, o aumento no tempo de extração não resulta no aumento da massa de soluto extraída. Quanto maior o coeficiente de partição do soluto, semelhança entre as propriedades físico-químicas do soluto com a fase extratora, maior será a quantidade de soluto extraído [47].

1.3.1 Extração sortiva em barra de agitação

A extração sortiva em barra de agitação (SBSE) foi introduzida em 1999 por Baltussen e colaboradores [48]. Esse método de extração sortiva utiliza uma barra de agitação magnética revestida com polidimetilsiloxano (PDMS) como fase extratora. Assim, essa técnica baseia-se no equilíbrio de partição do soluto nas diferentes fases presentes no sistema analítico.

Para a extração sortiva, a barra de agitação magnética revestida com PDMS é diretamente inserida na amostra ou no “headspace” e agitada até atingir o equilíbrio de partição dos solutos entre as fases extratora e aquosa (amostra). Os solutos são então sorvidos na fase extratora e tem sido dessorvidos termicamente no injetor de um cromatógrafo a gás. Assim, essa técnica simples e de alta sensibilidade poder ser utilizada por solutos voláteis e semi-voláteis.

Em análises com compostos termolábeis ou com alta massa molar, o processo de dessorção da barra magnética tem sido realizado em uma alíquota de solvente e depois analisado com por exemplo por cromatografia líquida (LC).

A barra de agitação magnética utilizada no processo SBSE é revestida com 25-125 μL (0,3-1,0 mm espessura) de polidimetilsiloxano (PDMS), Figura 3. Para evitar a decomposição da fase polimérica em contato direto com o tubo metálico, este é encapsulado com vidro e as extremidades da barra não são revestidas com o polímero.

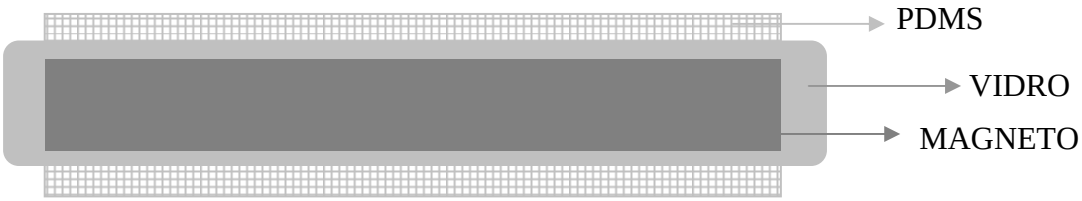


Figura 3. Ilustração da barra de agitação magnética com o recobrimento de PDMS.

1.3.1.1 Princípios teóricos da SBSE

A técnica SBSE baseia-se no processo de partição (absorção) assim como na extração líquido-líquido. Contudo, não utiliza solvente orgânico, ou apenas um pequeno volume, no processo de dessorção. No processo de adsorção, os solutos interagem com os sítios ativos presentes na superfície da fase extratora, já na extração absortiva (SBSE) os solutos solubilizam na fase extratora (PDMS). Como conseqüência, o volume e a área superficial de fase extratora irão influenciar nas taxas de recuperação da técnica SBSE [49-51].

O PDMS (Figura 4) tem sido muito utilizado como fase de extração sortiva em razão de características específicas como, boa estabilidade térmica (atua como líquido entre -20 a 320°C), os fragmentos de massas da degradação do polímero são característicos do silicone, os quais podem ser facilmente discernidos com o uso de detector de massas, o mecanismo de extração dos solutos é baseado na absorção (processo de partição), ou seja, os solutos são solubilizados na fase polimérica. A força de retenção, no processo de absorção, é mais fraca, quando comparada à observada no processo de adsorção, o que permite rápida dessorção térmica dos solutos em temperaturas medianas, minimizando a perda de solutos termolábeis. O

equilíbrio de partição ou capacidade de retenção de um determinado soluto em PDMS, não é influenciado pela presença de outros solutos, ou interferentes da matriz. Os solutos apresentam diferentes equilíbrios de partição (constante de partição) com a fase PDMS, não ocorre competição ou deslocamento dos solutos (que apresentam menor constante de partição) da fase extratora, o que resulta em métodos analíticos com ampla faixa de linearidade.

Assim, o uso do PDMS como fase extratora apresenta vantagens como taxas de extração próximas a 100 %, alta estabilidade, baixa reatividade e dessorção térmica rápida em temperaturas médias [52-54].

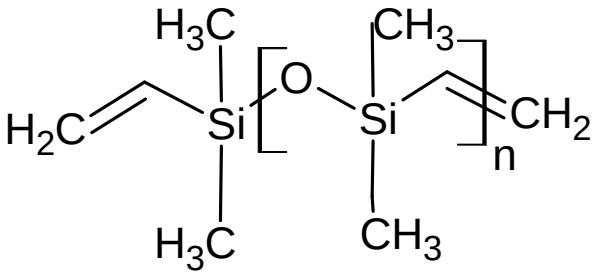


Figura 4. Estrutua do oligômero de PDMS (n=60).

Outras fases extratatoras tem, recentemente, sido desenvolvidas. Liu e colaboradores [55], por exemplo, utilizaram o processo de sol-gel para o desenvolvimento de um revestimento misto de PDMS e polimetilhidrosiloxano) [56]. Os autores utilizaram esta fase para analisar amostras de água com hidrocarbonetos aromáticos. O método desenvolvido gerou limites de quantificação de 0,18 – 20 pg mL^{-1}.

Lambert e colaboradores [59] usaram uma fase extratora empregando alquil-diol-silica (ADS), como recobrimento e analisaram cafeína e seus

metabólitos em fluidos biológicos, empregando a dessorçao líquida e análise por LC-UV. Os valores de recuperação encontrados foram de até 102%. As barras desenvolvidas neste estudo foram diretamente inseridas em fluidos biológicos sem que ocorresse sorção irreversível dos compostos endógenos, como as proteínas, junto à fase extratora. Com isso, as barras puderam ser utilizadas por mas de 50 vezes, sem perda da eficiência de extração.

Melo e colaboradores [57] desenvolveram um revestimento misto de PDMS e poli(pirrol) para análises de antidepressivos não tricíclicos em amostras de plasma. O método padronizado e validado, para análise por LC-UV, apresentou limites de quantificação de 20 a 30 ng mL^{-1}, com taxas de recuperação de 50 a 90% e precisão inter ensaio com coeficiente de variação menores que 15%.

A SBSE é controlada pelo coeficiente de partição dos solutos entre as fases, PDMS e aquosa. O coeficiente de partição tem sido correlacionado com o coeficiente de distribuição octanol/água (Ko/w). Embora não totalmente correto, o Ko/w tem sido utilizado para estimar a eficiência de extração para um determinado soluto quando utilizada a fase extratora PDMS [58-60].

O coeficiente de partição do soluto entre as fases PDMS e amostra aquosa (KPDMS/w) é calculado através da razão entre a concentração do soluto na fase de PDMS (C_{PDMS}) e a concentração do soluto na amostra aquosa (C_w), no equilíbrio. Esta razão corresponde ao produto do quociente entre as massas do soluto na fase PDMS (m_{PDMS}) e na fase aquosa (m_w) e β, onde β é igual à razão entre o volume da amostra e volume da fase extratora ($\beta = V_w / V_{PDMS}$) (Equação 1)

$$K_{o/w} \approx K_{PDMS/w} = \frac{C_{PDMS}}{C_w} = \frac{m_{PDMS}}{m_w} \cdot \frac{V_w}{V_{PDMS}} = \frac{m_{PDMS}}{m_w} \cdot \beta$$

Equação 1

A taxa de recuperação do processo SBSE é expressa através da razão entre a quantidade de soluto extraído (m_{PDMS}) e a quantidade de soluto inicial na amostra ($m_o = m_{PDMS} + m_w$) que corresponde às correlações entre o coeficiente de distribuição K_{PDMS}/β e a razao dos volumes das fase (β), conforme ilustrado na Equação 2:

$$\frac{m_{PDMS}}{m_o} = \frac{K_{PDMS/w}/\beta}{1+(K_{PDMS/w}/\beta)}$$

Equação 2

Segundo a Equação 2, , quanto maior a quantidade de PDMS, menor o valor β e maior será a eficiência da extração. Uma vez que o valor de $K_{PDMS/w}$ é similar ao valor de $K_{o/w}$ (Equação 1), $K_{PDMS/W\ /\beta}$ pode ser representado por $K_{o/w\ /\beta}$.

Segundo Baltussen et al. [48], para processo SBSE que apresenta $K_{o/w\ /\beta} = 1$, a recuperação do soluto será de 50%, e em valores de $K_{o/w\ /\beta}$ superiores a 5, a extração é considerada quantitativa. O valor de β, ou seja, a razão entre os volumes da amostra e da fase PDMS, deverá ser otimizado para cada aplicação, na qual o tempo da extração também deverá ser considerado. O aumento do volume da amostra e de PDMS resultará em maior tempo de extração para atingir o equilíbrio de partição. David e Sandra [61] descrevem que

para solutos apolares (log $K_{o/w}$ > 3), o aumento da quantidade de soluto extraído é proporcional ao aumento do volume da amostra.

1.3.1.2 Processo SBSE [62-64]

Para a extração SBSE, a barra de agitação magnética revestida com PDMS tem sido inserida diretamente na amostra (DI) ou no “headspace” do frasco e agitada até atingir o equilíbrio de partição dos solutos entre a amostra e fase PDMS [66].

Nas extrações DI, o frasco extrator (com tampa rosca) tem sido colocado sobre o agitador magnético e a amostra agitada cerca de 30 a 240 minutos, dependendo do volume de amostra. Após o processo de extração, a barra de PDMS é retirada do frasco, com o auxilio de uma pinça ou de uma haste metálica, enxaguada levemente com água milli-Q e cuidadosamente seca com um lenço de papel macio, para remoção de possíveis moléculas de água, açúcares, proteínas ou outros componentes da amostra.

As barras SBSE, dependendo da complexidade da amostra e cuidados do analista, têm sido reutilizadas de 20 a 100 vezes. Os solutos voláteis e semi-voláteis têm sido termicamente dessorvidos no injetor de um cromatógrafo a gás, resultando em uma técnica simples e de alta sensibilidade analítica.

Para as análises SBSE/LC de compostos termolábeis ou de alta massa molar, o processo de dessorção SBSE tem sido realizado através da inserção da barra SBSE em um micro tubo contendo alguns µL de fase líquida, fase móvel ou solvente orgânico, com agitação magnética ou em banho de ultra-

som, com ou sem controle da temperatura. Na lavagem da barra não ocorre perda de soluto, pois este encontra-se sorvido na fase PDMS [67].

Quando comparado com a técnica SPME, o processo de dessorção SBSE é mais lento devido ao maior volume de fase PDMS. Contudo, tem apresentado maiores taxas de recuperação.

Para aumentar a sensibilidade analítica é possível também o uso de duas ou mais barras de SBSE. De acordo com a Equação 2, nas extrações realizadas com uma única barra de extração, com grande volume de amostra observa-se diminuição da quantidade de soluto extraído pela fase PDMS. Dessa forma, o aumento no volume da amostra, resulta no aumento de β e, consequentente, no aumento do tempo de extração. Quando um sistema de dessorção térmica simultânea de barras é utilizado, o valor de β, igualmente como o tempo de extração, não aumenta e eficiência da extração não diminui. Assim, o uso desse sistema aumenta a sensibilidade analítica do método [68, 69].

1.3.1.3 Otimização do Processo SBSE

No processo de extração com SBSE, a otimização das variáveis se faz necessária para aumento da eficiência de extração e menor tempo de análise.

Durante o processo, os solutos migram da amostra para a fase PDMS. A difusão dos solutos para a fase extratora, é controlada cineticamente, sendo afetada pelo volume da amostra, velocidade de agitação, dimensões da barra de agitação e do revestimento, e, portanto, devendo ser otimizado para cada análise [70].

Para solutos apolares (log Ko/w > 3) a quantidade de soluto extraído aumenta proporcionalmente com o aumento do volume de amostra. Contudo, para solutos mais polares, o aumento linear das taxas de recuperação não tem sido observado. Assim, tem sido necessário otimizar os volumes de amostra e de fase extratora, tendo em vista os solutos e a sensibilidade analítica .

A difusão dos solutos também é favorecida pelo aumento da temperatura, diminuindo assim o tempo necessário para atingir o equilíbrio de partição. Contudo, o coeficiente de distribuição dos solutos diminui com a fase extratora, variações aceitáveis encontram-se na faixa de 1 a 2°C .

1.3.2 Análises quantitativas

A eficiência de extração para amostras de fluidos biológicos é influenciada pelos componentes da matriz e, portanto as curvas analíticas deverão ser preparadas com amostras biológicas isentas dos analitos (branco de referência) enriquecidas com os analitos em diferentes concentrações.

As determinações quantitativas devem ser realizadas pelo método da padronização interna, em concentrações em que o sinal analítico do padrão interno seja similar à concentração do soluto correspondente ao ponto central da curva analítica.

Fernandes e colaboradores [71] empregaram a extração em barra para a análise de fluoxetina em amostras de plasma e observaram que, mesmo após precipitação das proteínas do plasma para minimizar influência destas no processo de extração, as taxas de recuperação analítica do fármaco foi de

57%. Segundo os autores, a baixa taxa de recuperação é decorrente da alta ligação do fármaco às proteínas do plasma.

1.3.3 Aplicações

A SBSE tem sido utilizada com êxito em diferentes análises de fármacos e outras substâncias nas mais diversas amostras biológicas como: plasma, urina, soro, escarro e esperma (Tabela 1)

Tiepoint e colaboradores [64] analisaram 25 fármacos em amostras de urina. Neste estudo, os pesquisadores avaliaram vários fármacos e obtiveram altas taxas de recuperações.

Em outro estudo, ácido tubérculo foi analisado em amostra de escarro demonstrando, assim a aplicabilidade da técnica SBSE para análises de rotina. O tempo das análises foram menores que 60 minutos com precisão e exatidão equivalentes ao método padrão de diagnóstico, o qual requer 8 semanas para obtenção do resultado [72].

Storpforth e colaboradores [73] analisaram testosterona e epitestosterona em amostras de urina de pacientes HIV positivos por meio da técnica TD/GC-MS. Segundo os autores, os pacientes HIV positivos apresentam menor excreção destes hormônios. Os limites de quantificação encontrados foram: 0,9 ng mL^{-1} para a testosterona e 208 ng mL^{-1} para a epitestosterona.

Na literatura há poucos trabalhos empregando a eletroforese capilar e SBSE em amostras biológicas. Rosário e colaboradores [74], analisaram hidrocarbonetos policíclicos aromáticos por cromatografia eletrocinética micelar

(MEKC) em combinação com SBSE. Os resultados mostraram precisão menor que 12% e limites de detecção entre 2 a 11 μg L^{-1}.

Tabela 1. Aplicações da técnica SBSE para análise em fluídos biológicos.

Soluto e matriz	**Condições de extração**	**Detecção**	**LOQ**	**Referências**
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	90 minutos, 20 ^{o}C a 1500 rpm	MEKC-DAD	2-11 μg L^{-1}	72
Antidepressivos não tricíclicos	40 minutos a 40 ^{o}C a 1100 rpm	LC-UV	20-50 ng mL^{-1}	10
Cafeína e metabólitos em plasma	30 min a 1000 rpm	LC-UV	25 ng mL^{-1}	12
Fluoxetina em plasma	30 min 25 ^{o}C a 900 rpm	LC-MS	3 ng mL^{-1}	24
Barbitúricos em urina	60 min a 1000 rpm	TD-CG-MS	1 μg L^{-1}	17
Alquifenóis em urina e plasma	60 min, 25 ^{o}C a 500 rpm	TD-CG-MS	0,04-0,004 ng mL^{-1}	75
Bisfenol A em urina, plasma e saliva	45-120 min a 500-1000 rpm	TD-CG-MS	Urina: 20 pg mL^{-1}, plasma: 100 $pgmL^{-1}$ e saliva: 20 pg mL^{1}	76

Continua Tabela 1...

...continuação da Tabela 1.

Soluto e matriz	Condições de extração	Detecção	LOQ	Referências
Ácido tubérculo em escarro	30 min a 1000 rpm	TD-CG-MS	0,2 ng mL^{-1}	[77]
4-hidroxinonenol em urina	50 min, 42 ^{o}C a 1100 rpm	HD-TD-CG-MS	22,5 pg mL^{-1}	[25]
Hormônios em água e em urina	4 h a 750 rpm	LC-DAD	75-300 $\mu g\ mL^{-1}$	[78]
Esteróides em urina	1,5h a 600 rpm	LC-DAD	0,2-1,2 $\mu g\ L^{-1}$	[79]

LOQ: limite de quantificação. TD-GC-MS: dessorção térmica – cromatografia gasosa – espectrometria de massa. HD-TD-CG-MS derivatização em fase gasosa – derivatização térmica – cromatografia gasosa – espectrometria de massas.

1.3.4 Micro extração em sorvente empacotado

A microextração em sorvente empacotado (MEPS), recente técnica de preparo de amostra, baseia-se na miniaturização da técnica convencional de extração em fase sólida (SPE), onde os volumes das amostras e dos solventes utilizados na etapa da eluição foram reduzidos de mililitros para microlitros (10-1000 μL) [80].

Em MEPS, aproximadamente 1 mg de material sorvente seletivo é empacotado e conectado à agulha de uma microsseringa (100 – 250 μL), ou seja, integrado à microsseringa, como um *plug* ou microcoluna (aproximadamente 1 cm de comprimento por 0,2 mm de diâmetro interno)

(Figura 5). A MEPS pode ser acoplada (em linha) às técnicas de separação, LC, GC ou à eletroforese capilar (CE), ou seja, os solutos sorvidos na microcoluna poderão ser eluídos (dessorvidos), durante a etapa de introdução (injeção) da amostra no sistema analítico. O processo MEPS (extração e introdução da amostra), quando acoplado ao injetor automático pode ser totalmente automatizado.

As colunas SPE, geralmente são utilizadas uma única vez e descartada, já as microcolunas MEPS, dependendo da complexidade da amostra e dos cuidados do analista, podem ser reutilizados de 50 a 100 vezes.

Diferentes fases seletivas MEPS, ou seja, com diferentes mecanismos de extração, estão comercialmente disponíveis, tais como sílica (fase normal), C2, C8, C18 (fase reversa), trocador de cátions forte (SCX), trocador de ânions forte (SAX) e fase mista (C8 + SCX).

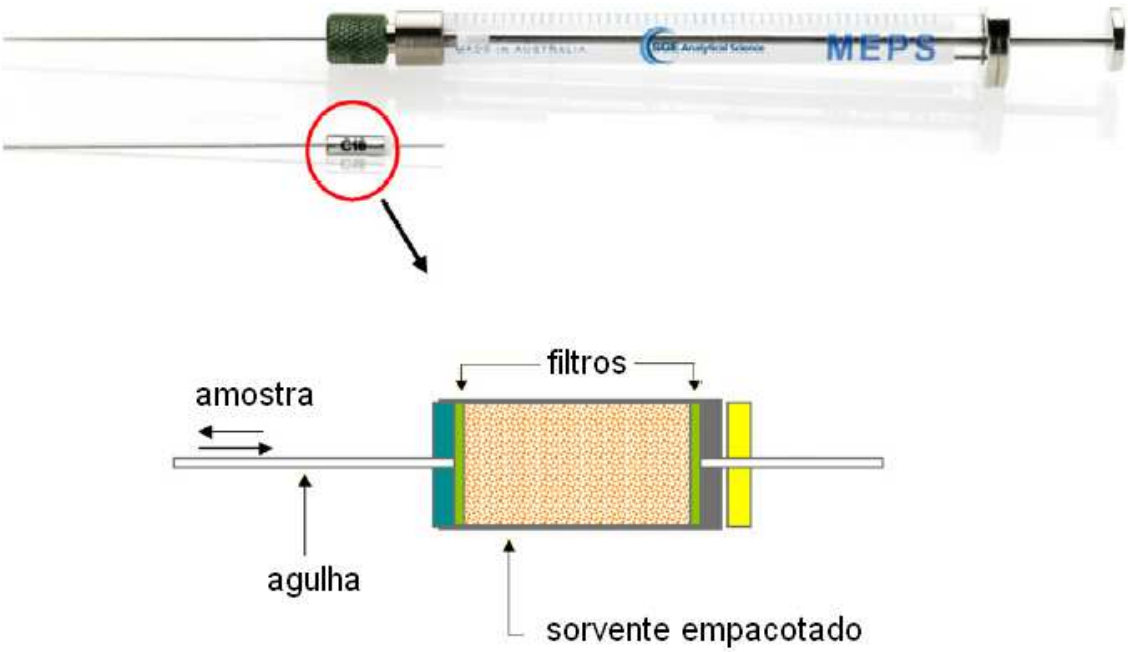


Figura 5. Microsseringa MEPS (250 μL) e microcoluna com material sorvente empacotado [81].

1.3.4.1 Processo MEPS para a determinação de fármacos em fluidos biológicos

Inicialmente, as amostras de plasma (10-250 μL) têm sido diluídas em água ou em solução tampão (1:4 v/v) e centrifugadas por 2 min (precipitação das proteínas), já as amostras de sangue total têm sido diluídas 20 vezes. As soluções tampão com valores de pH extremos (pH < 3 ou pH > 7) poderá danificar as fases sorventes à base de sílica.

Com o auxílio da microsseringa MEPS, os fármacos têm sido sorvidos (extraídos) na fase sólida através dos processos aspirar/dispensar a amostra no mesmo frasco contendo o fluido biológico ou aspirar (frasco) e dispensar no descarte, manualmente ou com injetor automático.

A extração tem sido realizada aspirando a amostra uma única vez ou mais (vários ciclos aspirar/dispensar), quando a pré-concentração dos solutos é requerida. A seleção do sorvente é um fator importante para a obtenção de altas taxas de recuperação, por exemplo: C2-C18 são fases adequadas para extração de solutos lipofílicos, já as fases poliméricas, tais como: poliestireno-divilnilbenzeno com grupos iônicos quimicamente ligados (troca iônica) ou fases mistas (C8 + SCX) são adequadas para as determinações de solutos polares como os compostos ácidos e básicos.

O procedimento para o uso de MEPS envolve quatro etapas: 1) a amostra é coletada com a seringa; 2) a seringa é lavada com uma solução para eluir os interferentes; 3) O eluente é aspirado e 4) o analito é eluído (Figura 6).

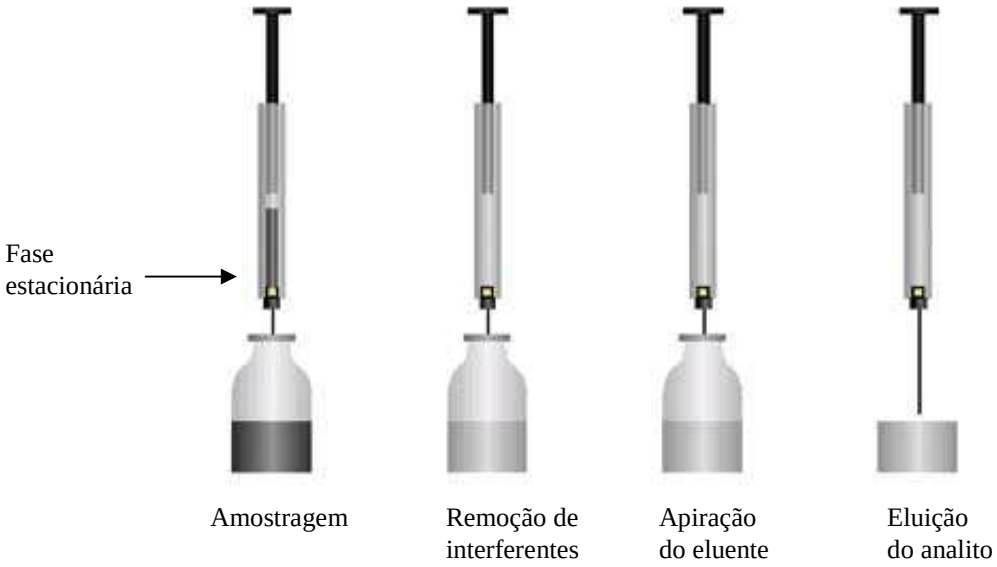


Figura 6. Ilustração das etapas envolvidas na microextração (MEPS) [82].

Após processo de extração, a fase sólida é lavada com água ou solução água/metanol (50 μL) para remover os compostos endógenos dos fluídos biológicos. Na etapa de limpeza, a porcentagem de solvente orgânico, assim

como o pH da solução deverão ser considerados para diminuir a perda do soluto. O aumento da porcentagem de solvente orgânico na solução eluente, aumenta a perda do analito. Para minimizar o efeito da matriz e obtenção de extratos mais puros, em análises de fármacos básicos, soluções aquosas de limpeza com 5% de metanol ou isopropanol (eliminação de fosfolipídeos) têm sido utilizadas.

Os solutos tem sido eluídos com solvente orgânico ou fase móvel (20-50 μL) diretamente no injetor do sistema analítico. O ajuste do pH da solução (ionização dos solutos) eluente tem sido fator importante para a obtenção de altas taxas de extração. Considerando a alça de amostragem LC, o volume da solução eluente deverá ser o menor possível.

Para reutilizar as microcolunas MEPS, estas devem ser lavadas (entre as injeções) 3-4 vezes com água e 4-5 com solvente utilizado na etapa de eluição. Este procedimento minimiza o efeito de memória para valores menores que 0,02 %.

1.3.5 Aplicações

A técnica MEPS tem sido aplicada para a extração de uma grande variedade de fármacos e metabólitos em amostras biológicas. A Tabela 2 mostra alguns desses trabalhos.

Tabela 2. Aplicações da técnica MEPS para análise de fármacos e metabólitos em amostras biológicas.

Soluto	Matriz/ volume de amostra	Sorvente	Detecção	LOQ	Referência
Fluoroquinolonas	Urina (140 µL)	C18	CE-MS	6,3-10,6 ug/L	83
Lidocaína, mepivacina e bupivacaína	Plasma (200 µL)	C18	CE-LC/MSD	5,4 µg/mL 4,9 µg/mL 2,1 µg/mL	84
Lidocaína, ropivacaína e bupivacaína	Plasma (50 µL)	SCX	LC-MS/MS	2 nmol/L	85
Ropivacaína	Urina (50 µL)	Poliestireno	LC-MS/MS	5 nmol/L	86
Lidocaína, prilocaína, mepivacaína e ropivacaína	Plasma (50 µL)	C2	GC-MS/MS	5 nmol/L	87
Ropivacaína	Plasma (50 µL)	MIP	LC-MS/MS	2 nmol/L	88
Ropivacaína	Plasma (50 µL)	C2 e C8	LC-MS/MS	2 nmol/L	89
Citalopram, mirtazapina, paroxetina, sertralina, fluoxetina	Plasma (400 µL)	C8+SCX	LC-UV	10-25 ng/mL	90

Continua Tabela 2...

...Continuação da Tabela 2.

Soluto e matriz	Matriz/ volume de amostra	Sorvente	Detecção	LOQ	Referência
Dopamina e sertonina	Urina (30 µL)	C8	LC-MS/MS GC-MS/MS	50 ng/mL	91
Ciclofosfamida	Sangue (20 µL)	C2	LC-MS/MS	0,1 µg/mL	92
Ciclefosfamida	Plasma (25 µL)	C8	LC-MS/MS	0,5 µg/mL	93
Busulfan	Plasma (25 µL)	Poliestireno	LC-MS	0,5 ng/mL	94
Roscovitina	Plasma (50 µL)	Poliestireno	LC-MS/MS	0,5 ng/mL	95
Risperidona e metabólitos	Plasma e saliva (100 µL)	C8	LC	0,5 ng/mL	96
acebutolol e metoprolol	Plasma e urina (50 µL)	Poliestireno	LC-MS/MS	1 ng/mL	97
Metamfetamina e amfetamina	Cabelo (5 mg)	SCX:C18	CG/MS	0,20 ng/mg	98

LOD: limite de detecção. MIP: polímero molecularmente impresso.

1.4 Eletroforese Capilar (CE)

A eletroforese capilar é uma poderosa técnica de separação baseada na migração de compostos eletricamente carregados sobre a influência de um campo elétrico. Em CE, a separação é conduzida em capilares de sílica fundida com dimensões de 30 a 100 μm de diâmetro interno, e de comprimento que geralmente varia entre 20 a 100 cm. Esses capilares podem ser revestidos internamente para evitar a formação de fluxo eletroosmótico.

Vários modos de separação em CE são possíveis: zona (CZE), isotacoforese (CITP), ponto isoelétrico (CIEF), gel (CGE), eletrocromatografia (CEC) e cromatografia eletrocinética micelar (MEKC). A escolha do modo de separação depende do tipo de amostra a ser analisada [99].

Um esquema de um sistema de eletroforese capilar é apresentado na Figura 7, o qual contém dois reservatórios para o tampão, um reservatório para a amostra, uma fonte de alta tensão, detector, computador para a aquisição de dados, eletrodos e o capilar.

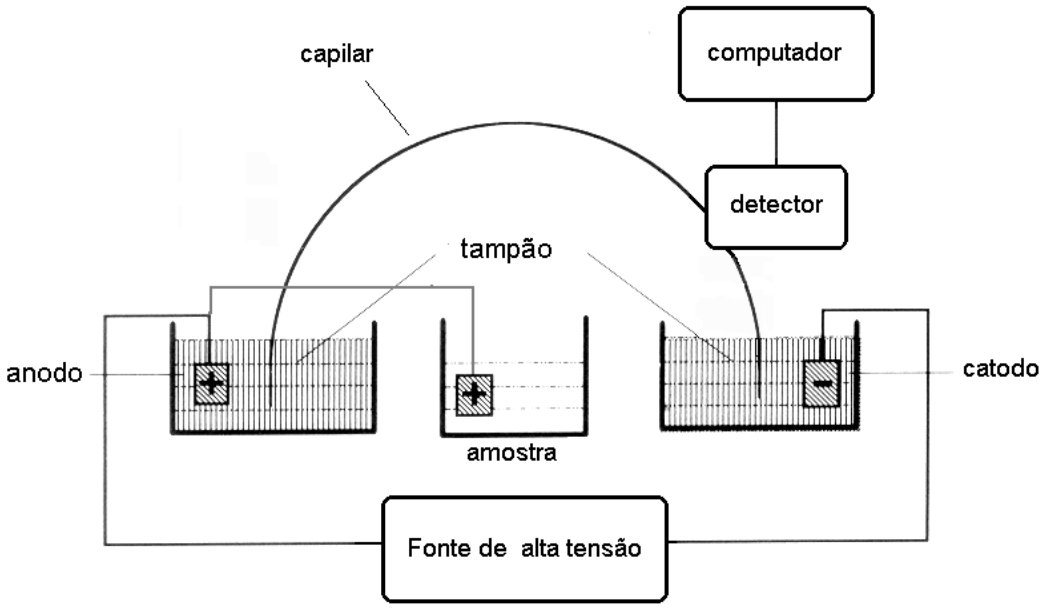


Figura 7. Representação esquemática de um sistema de eletroforese capilar [100].

Na eletroforese capilar de zona (CZE), a qual deu origem aos outros modos de separação, o capilar é preenchido com a solução tampão e após a amostra ser introduzida no capilar, um campo elétrico é aplicado. Os cátions migram para o cátodo e os ânions migram para o ânodo. Como estes íons possuem mobilidades diferentes eles serão detectados em tempos diferentes. A mobilidade basicamente depende da relação carga/tamanho do analito. Assim, um íon de menor tamanho migra mais rápido que um íon de maior tamanho e mesma carga, e um íon de maior carga migra mais rápido que um íon de menor carga e mesmo tamanho. As moléculas de tampão também se movimentam com a aplicação do campo elétrico formando o fluxo eletroosmótico. Isto ocorre, devido aos grupos silanóis presentes na superfície interna do capilar. Quando o capilar é preenchido com solução (geralmente um

tampão) com pH acima de 2, ocorre a ionização dos grupos silanóis (Si-OH) a silanoatos (Si-O-).

Os grupos silanoatos atraem os cátions da solução tampão formando uma primeira camada interna de cátions na parede do capilar. Esta camada é chamada de camada fixa. Entretanto, mais cátions são atraídos para a parede do capilar e desse modo, ocorre a formação de uma segunda camada de cátions a qual é móvel. Isto é devido a força de atração eletrostática que não é mais suficiente para manter esta camada fixa, já que esses cátions também sofrem a ação do campo elétrico de alta intensidade, sendo então, atraídos para o cátodo e como estes cátions estão solvatados, arrastam também a solução dando origem ao fluxo eletroosmótico (EOF), como pode ser visto na Figura 8.

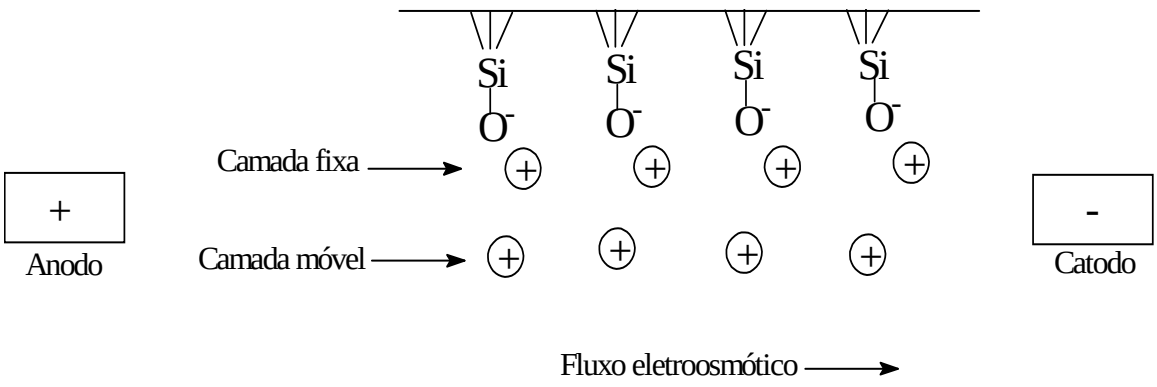


Figura 8. Representação do fluxo eletroosmótico formado no capilar [101].

Devido ao fluxo eletroosmótico os cátions serão acelerados na direção do cátodo, as moléculas neutras serão arrastadas e os ânions migrarão mais lentamente, pois estarão migrando para o ânodo, porém sendo arrastados na direção do cátodo quando a magnitude do EOF for maior que a mobilidade dos mesmos.

Outra modalidade de CE é denominada de eletroforese em meio não-aquoso (NACE), pois a separação ocorre em meio não aquoso, constituído principalmente de solventes orgânicos. A NACE tem sido usada quando compostos hidrofóbicos apresentam mobilidades similares em meio aquoso, dificultando a resolução. A adição de solventes orgânicos modifica a seletividade do processo de separação eletroforética, pois em razão das diferentes propriedades físico-químicas dos solventes orgânicos, as constantes de ionização em meio orgânico são diferentes das constantes em meio aquoso. A mobilidade efetiva de um composto é proporcional a sua carga (q) e é inversamente proporcional ao tamanho de solvatação (r). Dessa forma, dois compostos que possuem a mesma razão q/r em um dado meio eletrolítico não podem ser separados por eletroforese, contudo, se esse meio for alterado pela adição de um solvente orgânico a carga do analito e/ou o tamanho de solvatação podem ser diretamente influenciados e, portanto, o grau de ionização dos compostos será alterado, levando a uma diferenciação nas mobilidades eletroforéticas nesse meio [101-105].

Outra característica importante do sistema NACE é a baixa condutividade, o que minimiza a geração de calor, devido ao efeito Joule, proporcionando separação eficiente. Assim, NACE apresenta vantagens como baixa corrente elétrica evitando, assim, o aquecimento interno do capilar. Como

resultado, é possível a aplicação de altas voltagens em capilares pequenos, permitindo análises rápidas e/ou melhoramento na resolução dos picos [105].

1.4.1 Aplicações

A análise de compostos utilizando NACE tem tido bastante interesse desde 1993. Tal aumento nas análises utilizando NACE é devido à comercialização de aparelhos com frascos devidamente selados para evitar a evaporação dos compostos voláteis. A evaporação do eletrólito de separação causa variação no tempo de migração dos analitos e queda de corrente.

NACE tem sido empregada com êxito nas análises de diferentes fármacos em diversas amostras biológicas. A Tabela 3 apresenta alguns trabalhos empregando NACE para a análise de fármacos em amostras biológicas.

Tabela 3. Aplicações da técnica NACE para análise de fármacos em amostras biológicas.

Soluto	Matrix	Solventes (v/v)	Eletrólito de separação	Detecção	Referência
Anfetamina	Plasma	ACN/MeOH (20:80, v/v),	25 mM formiato de amônia + 1M ácido fórmico	MS	106
Anestésico	Plasma	ACN/MeOH 60:40	2 M ácido fórmico e 70 mM NH_4Ac	MS	107
amitriptilina, imipramina doxepina, clomipramina e metabolitos	Plasma	ACN	1M HAc, 50 mM NH_4Ac, 10 mM SDS	UV	108
Imipramina, amitriptylina e metabólitos	Plasma	ACN	50 mM NH4Ac e 1M HAc	UV	109
Fenotiazina	Urina/ sangue	MeOH/ACN 80:20	17 mM NH_4Ac/220	UV	110
Fenotiazina	Sangue	MeOH/ACN 80:20	70 mM NH_4Form/2 M HForm	UV	111
Gleevec e metabólitos	Urina	MeOH/ACN 80:20	12 mM NH_4Ac/87.6 mM HAc	UV	112

Continua Tabela 3...

...Continuação da Tabela 3.

Soluto	Matrix	Solventes (v/v)	Eletrólito de separação	Detecção	Referência
Fluoxetina e metabólinas	Urina	MeOH/ACN 70:30	15 mM NH_4Ac	UV	[113]
Tamoxifen, impramina e metabólitos	Urina	MeOH/ACN 80:20	17 mM NH_4Ac/220 mM HAc	UV	[114]
Lidocaína e metabólitos	Plasma	ACN/MeOH 60:40	70 mM NH_4Form/2 M HForm	MS	[115]
Paroxetina, tamoxifen e metabólitos	Urina	MeOH/ACN 80:20	18 mM NH_4Ac/200 mM HAc	UV	[116]
Paroxetina e metabólitos	Urina	MeOH/ACN 90:10	25 mM NH_4Ac/175 mM HAc	UV	[117]
Anfetamina	Urina	MeOH/FA 70:30	20 mM NH_4Ac/100 mM HAc	FS	[118]
Tamoxifen e metabólitos	Urina	MeOH/ACN 70:30	20 mM NH_4Ac	MS	[119]

1.5 Validação Analítica [120, 121]

A validação analítica é um processo que fornece evidência documentada de que o método padronizado é confiável ao que se aplica, ou seja, ao objetivo

proposto. A validação analítica consiste de procedimentos, ensaios laboratoriais, que visam minimizar erros, assegurar credibilidade às medidas obtidas, principalmente quando se trata da análise de compostos de interesse biomédico em matrizes biológicas. Para que os resultados sejam confiáveis, é imperioso que as variações analíticas sejam mantidas dentro de limites pré-estabelecidos por critérios baseados na finalidade da análise, sistemas analíticos e estudos estatísticos.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é uma das agências regulamentadoras de programas de qualidade de serviços no Brasil que determina os parâmetros a serem avaliados nas determinações de fármacos em fluidos biológicos, bem como seus limites de tolerância.

A ANVISA preconiza que os ensaios bio-analíticos deverão ser realizados com amostras branco de referência enriquecidas com os solutos (padrões analíticos certificados) e com adição de padrão interno. A validação analítica dos métodos NACE padronizados neste trabalho basearam-se no estabelecimento dos seguintes parâmetros preconizados pela ANVISA: especificidade, linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, precisão intra e interensaios e recuperação.

1.5.1 Linearidade

A linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito nas amostras, em uma dada faixa de concentração. É avaliada por meio de um

gráfico analítico em que se aplica a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

A ANVISA recomenda que se construa um gráfico analítico para cada fármaco, utilizando-se a mesma matriz biológica proposta para o estudo, devendo-se incluir a análise da amostra branco (matriz biológica isenta de padrão do fármaco e do padrão interno), da amostra zero (matriz biológica mais o padrão interno) e de cinco a oito amostras contendo padrão do fármaco e padrão interno. Além disso, fatores como desvio padrão relativo menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o limite de quantificação (LOQ), desvio padrão relativo menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva analítica e coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98 devem ser considerados na avaliação do linearidade do método analítico.

1.5.2 Precisão

A precisão mostra o grau de dispersão dos resultados quando o método é aplicado em várias amostras, sendo este, em um mesmo laboratório, com o mesmo modo de preparo da amostra e utilizando os mesmos equipamentos. Geralmente a precisão é expressa pelo desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV%) dos resultados. Ainda, de acordo com a ANVISA, a precisão do método é verificada através de, no mínimo, três concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se, no mínimo, cinco determinações por concentração. A precisão deve ser determinada em um mesmo dia (precisão

intra dia) e em dias diferentes (precisão inter-dias); tanto a precisão intra-dia como a inter-dias não devem exceder 15%, exceto no limite de quantificação, a qual não deve ultrapassar 20%.

1.5.3 Limite de detecção (LOD)

É a menor concentração do analito que pode ser detectada com segurança. Este limite pode ser determinado com base em avaliação visual, relação sinal/ruído ou no desvio padrão e coeficiente angular da curva analítica. Pela regulamentação da ANVISA recomenda-se que LOD seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha base. A região adotada para a obtenção do ruído é de 20 vezes a largura do pico na meia altura, sendo 10 vezes antes e 10 vezes após o máximo do sinal analítico.

1.5.4 Limite de quantificação (LOQ)

É a menor concentração do analito que pode ser quantificada com segurança. De acordo com a ANVISA, nenhuma interferência significativa deve ser apresentada na amostra branco de referência no tempo de retenção do fármaco. O LOQ deve ser no mínimo cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branco de referência no tempo de retenção do fármaco. Além disso, o pico de resposta do fármaco no LOQ deve ser identificável e reprodutível com precisão de 20%.

1.5.5 Recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação próximas a 100% são desejáveis, porém, admitem-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata. A recuperação pode ser definida de duas formas: a) recuperação absoluta é uma relação entre a resposta do analito extraído da matriz enriquecida e a resposta do padrão analítico puro que não tenho sido submetido ao processo de extração. A resposta gerada pelo padrão não extraído representa uma recuperação de 100%; b) recuperação relativa utiliza um padrão interno, a recuperação é medida como uma relação entre as respostas dos analitos e a do padrão interno extraído de uma matriz enriquecida e as respostas dos analitos e do padrão interno quando não submetidos ao processo de extração.

1.5.6 Especificidade

Trata-se da habilidade do método de medir e diferenciar o analito de componentes que possam estar presentes na amostra, tais como metabólitos, impurezas, compostos de degradação ou componentes da matriz. As amostras da matriz biológica (amostra plasma de referência, livres dos analitos) deverão ser testadas utilizando o procedimento de extração e as condições propostas. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos com solução-padrão dos fármacos, em concentração próxima ao LOQ. Qualquer amostra de matriz biológica de referência (branco) que apresentar interferência significativa

no tempo de retenção dos analitos, metabólito dos mesmos ou padrão interno, deverá ser rejeitada. Caso uma ou mais das amostras analisadas apresentarem tal interferência, novas amostras de matriz biológica de referência deverão ser testadas. Caso uma ou mais destas amostras apresentarem interferência significativa no tempo de retenção dos fármacos, o método em ensaio deverá ser alterado visando eliminá-la. A resposta de picos interferentes no tempo de retenção dos fármacos deverá ser inferior a 20% da resposta do LOQ.

2. Objetivos

- Otimização das condições eletroforéticas para a análise dos antidepressivos citalopram, fluoxetina, paroxetina e sertralina;

- Desenvolvimento do método LLE/NACE-UV (extração líquido-líquido e eletroforese capilar com detecção na região ultravioleta) para análise simultânea dos antidepressivos em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica;

- Validação analítica do método LLE/NACE-UV padronizado;

- Análise de amostras de plasma de pacientes em terapia com antidepressivos;

- Desenvolvimento do método SBSE/NACE-UV para análise simultânea dos antidepressivos em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica;

- Validação analítica do método SBSE/CE padronizado;

- Análise de amostras de plasma de pacientes em terapia com antidepressivos

- Desenvolvimento do método MEPS/NACE-UV para análise simultânea dos antidepressivos em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica;

- Validação analítica do método MEPS/CE padronizado

- Análise de amostras de plasma de pacientes em terapia com antidepressivos

3. Materiais e métodos

3.1. Determinação de antidepressivos ISRSs em amostras de plasma por extração líquido-líquido e eletroforese capilar em meio não aquoso (LLE/NACE)

3.1.1.Padrões analíticos e reagentes

Os padrões primários dos antidepressivos foram gentilmente doados por diferentes laboratórios. A fluoxetina foi doada pelo Laboratório Lilly (São Paulo, Brasil), a paroxetina pela Libbs (São Paulo, Brasil) e o citalopram (CIT) e a sertralina (SER) pela Ciba–Geigy (São Paulo, Brasil). As soluções padrão diluídas dos antidepressivos foram preparadas a partir da diluição de suas respectivas soluções estoques de 1mg mL^{-1} em metanol.

O metanol, n-hexano e acetonitrila, grau HPLC, foram adquiridos do fornecedor Mallinckrodt (Paris, Kentuky, USA); fosfato de sódio monobásico, acetato de sódio e ácido acético da Mallinckrodt Baker (Xalostoc, México). O álcool isoamílico foi adquirido da Merck (Darmstadt, Germany). Acetato de amônio, acetato de sódio, hidróxido de sódio e hidróxido de amônio foram adquiridos da Mallinckrodt (Phillipsburg, New Jersey, USA). Ácido fórmico foi adquirido da Mallinckrodt Baker (Xalostoc, México) e dodecil sulfato de sódio (SDS) da Sigma (St Louis, MO, U.S.A.) A água utilizada nos ensaios foi purificada pelo sistema Milli-Q, Millipore (São Paulo, Brasil).

3.1.2. Eletroforese capilar

O equipamento de eletroforese capilar HP3D com detector de arranjo de diodo (Agilent Technologies,Waldbron, Germany) foi utilizado com capilares de sílica fundida de 75 µm de diâmetro interno com comprimentos variados.

3.1.3. Otimização da separação eletroforética

Antes de iniciar a análise eletroforética, o capilar de sílica fundida foi condicionado com uma solução de NaOH 1 mmol L^{-1} por 2 minutos, em seguida com água por 2 minutos e por fim com o solução tampão de análise por 2 minutos. A injeção da amostra foi feita hidrodinamicamente por 10 segundos a 6,9 mbar. Em ensaios que não foi utilizado este procedimento de injeção, a condição modificada foi descrita na legenda da figura. A detecção UV foi realizada em 200 nm.

A escolha da voltagem a ser aplicada foi determinada construindo-se um gráfico de Ohm, onde se preencheu o capilar com a solução tampão utilizada e variou-se a voltagem aplicada anotando-se os valores de corrente.

3.1.3.1. Avaliação de diferentes soluções de eletrólito em meio aquoso

Diferentes soluções tampão foram avaliadas para a obtenção de adequada resolução dos fármacos em menor tempo de análise. As soluções tampão avaliadas foram as seguintes: fosfato de sódio (pH 2,0 a 3,2), acetato de amônio (pH 3,7 a 5,7), acetato de sódio (pH 3,7 a 5,7), formiato de amônio

(pH 2,7 a 4,7) e formiato de sódio (pH 2,7 a 4,7). As análises foram realizadas variando-se o pH das soluções tampão em 0,2 unidades, considerando as faixas de tamponamento .

A resolução dos fármacos também foi avaliada em solução tampão formiato de amônio pH 2,9 em diferentes concentrações (20 a 100 mM). No entanto, as condições eletroforética avaliadas não resultaram em satisfatória separação dos antidepressivos.

3.1.3.2. Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC)

A técnica de cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) foi também avaliada para a separação eletroforética dos fármacos.

As análises MEKC dos quatro antidepressivos foram realizadas em eletrólito fosfato de sódio 25 mM pH 7,5, dodecil sulfato de sódio 20 mM e metanol 70:30 (v/v). As condições de análise foram: tempo de injeção de 10 segundos a 6,9 mbar e 387,6 V/cm com polaridade inversa.

Nessas condições descritas, a separação dos quatro antidepressivos não foi satisfatória, decidiu-se então avaliar um sistema não-aquoso, a eletroforese capilar em meio não aquoso.

3.1.3.3. Eletroforese capilar em meio não aquoso (NACE)

A otimização da separação eletroforética foi avaliada em diferentes concentrações de acetato de amônio (10 a 100 mM), mas mantendo-se constante a concentração de ácido acético (2 M) em acetonitrila, tempo de

injeção 2s a 6,9 mbar, campo elétrico 478 V/cm, capilar de 75 µm de diâmetro interno e comprimento total de 41,8 cm, detecção em 200 nm.

Embora tenha obtido separação satisfatória nesta condição, o eletrólito ácido fosfórico em diferentes concentrações (0,50 a 1,75 mol L^{-1}) em acetonitrila foi também avaliado. A otimização do campo elétrico (300 V/cm – 600 V/cm) também foi realizada.

A Tabela 4 ilustra as condições eletroforéticas em meio não aquoso avaliadas para as análises dos antidepressivos. A identificação dos fármacos estudados, nas amostras de plasma, foi realizada pelos tempos de migração destes analitos em soluções padrões individualmente injetadas.

Para quantificação, utilizou-se o método do padrão interno (PI). A mirtazapina foi selecionada como padrão interno, pois além de possuir estrutura química semelhante aos solutos estudados, atualmente, tem sido pouco utilizado no tratamento da depressão, principalmente em associação com os antidepressivos, inibidores seletivos da recaptação de serotonina analisados. O PI tem sido usado como marcador interno para compensar os erros (perda dos fármacos) originados no preparo das amostras e em razão das variações da instrumentação analítica que podem alterar a área do pico.

Tabela 4. Condições eletroforéticas em meio não-aquoso empregadas na análise dos antidepressivos.

Coluna	Capilar com 75 µm de diâmetro interno
Eletrólito de separação	Ácido fosfórico em acetonitrila (0,50 a 1,75 mol L^{-1})
Comprimento de onda	200 nm
Modo e tempo de injeção	Hidrodinâmico 5 e 10 s a 6,9 mbar
Campo elétrico	(300-600 V/cm)
Pré-condicionamento	2 min NaOH 1 mmol L^{-1} 2 min H_2O 2 min eletrólito de separação

3.1.4. Amostras de plasma

As amostras de plasma de referência (branco), livres dos fármacos em análise, e sorologia negativa para hepatite B e C, HIV, chagas, HTLV I/II, TGP e sífilis foram cedidas pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP. Já as amostras dos pacientes foram coletadas de pacientes idosos (acima de 60 anos) em terapia com antidepressivos nas últimas duas semanas. Estas coletas foram realizadas de acordo com os critérios estabelecidos pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

3.1.5. Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido consistiu da adição de 50 μL de mirtazapina (100 μg mL^{-1} padrão interno), 200 μg NaCl, 200 μL de solução tampão borato 50m M (pH 9) e 3 mL hexano/álcool isoamílico (99:1, v/v) em 1 mL de plasma. Após 30 min de agitação em um agitador mecânico e após centrifugação a 1000 x g por 10 min, a fase orgânica foi transferida para um tubo e o solvente orgânico evaporado sob um fluxo de nitrogênio. Ao resíduo seco foi adicionado 50 μL de acetonitrila.

Um esquema demonstrando todas estas etapas é apresentado na Figura 9.

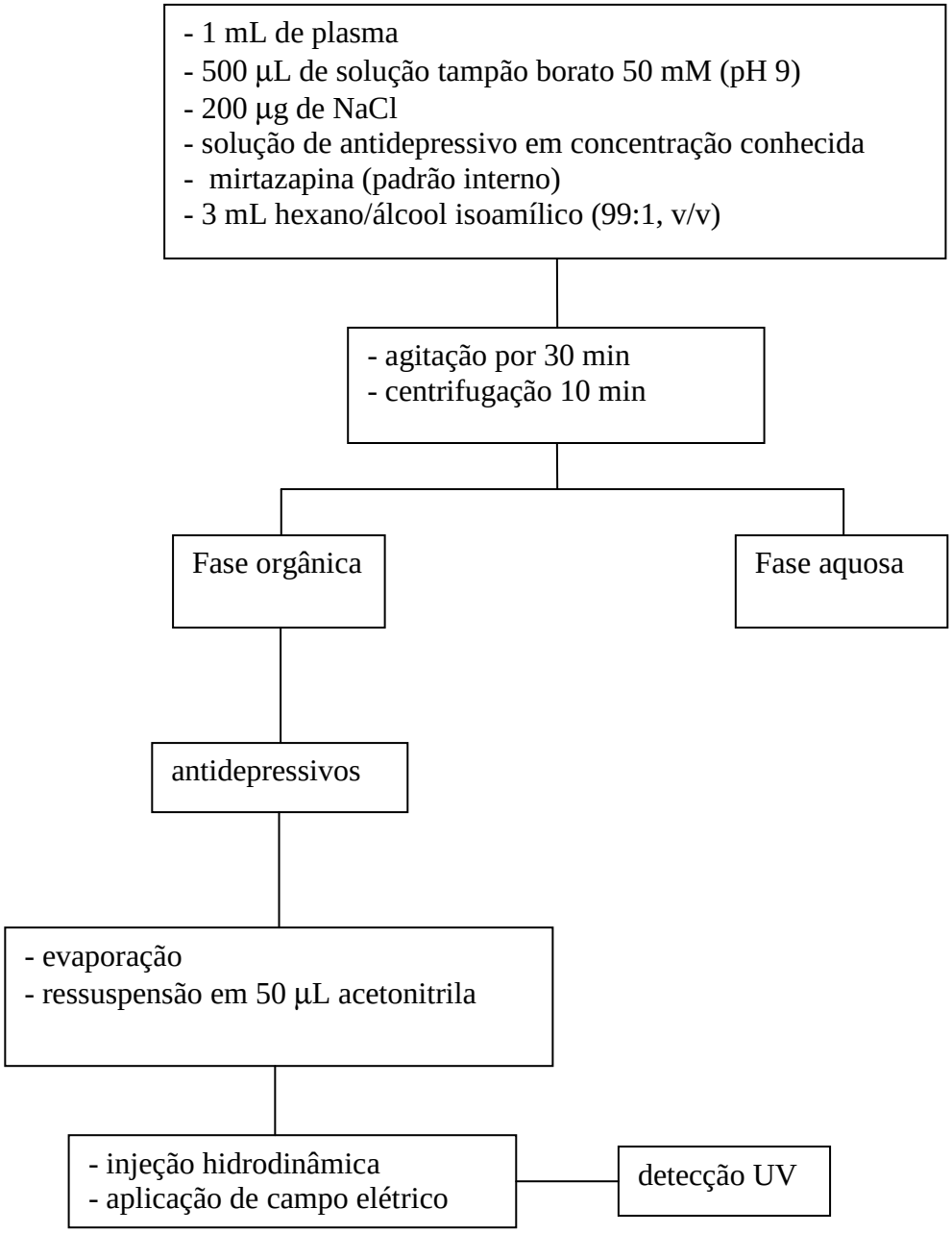


Figura 9. Esquema das etapas da LLE dos antidepressivos do plasma.

3.1.6 Validação analítica do método LLE/NACE-UV padronizado

3.1.6.1 Seletividade

Para avaliação da seletividade da metodologia desenvolvida, amostras de plasma branco de referência de diferentes procedências foram analisads nas condições LLE/NACE padronizadas. Os tempos de migração dos compostos endógenos das amostras biológicas foram comparados com os tempos de migração dos antidepressivos.

3.1.6.2 Linearidade

Para a avaliação da linearidade foi construída uma curva analítica para cada fármaco, ou seja, razão entre áreas dos picos dos antidepressivos e padrão interno “versus” concentrações dos fármacos adicionados. Para a elaboração destas curvas foram utilizados com os valores médios dos ensaios LLE/NACE de amostras de plasma branco de referência enriquecidas com os ISRSs em diferentes concentrações, considerando o intervalo terapêutico.

3.1.6.3. Precisão

A precisão representa o grau de repetitividade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio [3]. A repetibilidade do método foi determinada em um mesmo dia (precisão intra

ensaio) e em dias diferentes (precisão inter ensaio), em três níveis de concentrações.

A precisão foi ilustrada pelo coeficiente de variação (CV) dos resultados das análises realizados em replicatas, n=5.

O CV foi calculado usando a Equação 3:

$$CV(\%) = \frac{\rho}{\overline{X}} \cdot 100 \qquad \text{equação 3}$$

Onde:

ρ representa o desvio padrão das medidas e

X a concentração média determinada.

3.1.6.4 Limites de quantificação e detecção

Os limites de detecção foram avaliados por meio de diluições sucessivas das soluções dos fármacos. Definiu-se a altura do ruído como sendo a máxima variação da linha de base na região de obtenção do sinal referente ao composto de interesse [122]. Os limites de detecção dos fármacos foram estabelecidos como as concentrações que geraram picos com sinais analíticos superiores a três vezes o sinal do ruído da linha de base [123].

Os limites de quantificação do método LLE/NACE foram estabelecidos como as menores concentrações plasmáticas determinadas com precisão com CV ≤ 20%.

3.1.6.5. Recuperação

Os valores de recuperação do método LLE/NACE foram determinados comparando-se as áreas dos picos dos fármacos obtidas nos ensaios por injeção direta de soluções padrão no sistema NACE-UV, com as obtidas após os ensaios LLE/NACE de amostras de plasma enriquecidas os antidepressivos.

Para os cálculos de recuperação, três níveis de concentração foram avaliados: baixa, média e alta. A recuperação relativa foi estimada segundo a equação 4

$$\mathrm{Re}\,c = \frac{\dfrac{A_{ae}}{A_{pie}}}{\dfrac{A_{ap}}{A_{pip}}} \cdot 100 \qquad \text{equação 4}$$

Onde

A_{ae} é área do pico do soluto na amostra extraída;

A_{pie} é a área do pico padrão interno na amostra extraída;

A_{ap} é a área do pico do soluto em solução e

A_{pip} é a área do pico do padrão interno em solução.

3.1.6.6. Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência [124].

A exatidão foi estimada em três níveis de concentração (baixa, média e alta), contemplando o intervalo terapêutico dos fármacos, realizando-se no mínimo cinco determinações para cada fármaco [3]. O desvio não deverá exceder 15%, exceto para o LQ, para o qual se admitem valores menores ou iguais a 20%.

Assim sendo, os valores de áreas obtidos para cada fármaco no cálculo da precisão inter ensaio foram utilizados para o cálculo da exatidão, empregando-se a Equação 5

$$exatidão\,(\%) = \frac{\overline{X}}{CT} \cdot 100 \qquad \text{equação 5}$$

Onde:

X representa a concentração média determinada para o soluto com base na curva analítica e;

CT representa a concentração teórica (adicionada).

3.2. Determinação de antidepressivos ISRSs em amostras de plasma por extração sortiva em barra de agitação e eletroforese capilar em meio não aquoso (SBSE/NACE)

3.2.1 Condicionamento SBSE

As barras de agitação magnética revestida com polidimetilsiloxano, 0,5 mm de espessura e 10 mm de comprimento, foram adquiridas do fornecedor Gerstel GmbH (Mülheim Ruhr, Alemanha). Antes de ser utilizada nas extrações, as barras foram condicionadas por 24 horas em metanol, sob agitação; entre as extrações sucessivas, as barras SBSE foram lavadas com metanol por 30 min a 50 ^{o}C, sob agitação.

3.2.2. Condições eletroforéticas

As análises eletroforéticas foram realizadas em um equipamento de eletroforese capilar Beckman P/ACE System MDQ instrument 5500 CE Instruments com detector de arranjo de diodos (UV-Vis) e um capilar de sílica fundida (40 cm de comprimento e 75 μm de diâmetro interno).

Antes de iniciar a análise no eletroforese capilar, o capilar de sílica fundida foi condicionado com uma solução de NaOH 1 mmol L^{-1} por 2 minutos, em seguida com água por 2 minutos e por fim com solução tampão de análise por 2 minutos. A injeção da amostra foi feita hidrodinamicamente por 10 segundos a 6,9 mbar. Em ensaios que não foram utilizados este procedimento

de injeção, a condição modificada foi descrita na legenda da figura. A detecção UV foi realizada em 200 nm.

Para quantificação, utilizou-se o método do padrão interno (PI). A mirtazapina foi selecionada como padrão interno.

Tabela 5. Condições eletroforéticas empregadas na análise dos antidepressivos.

Coluna	Capilar com 75 µm de diâmetro interno
Eletrólito de separação	Ácido fosfórico (1,25 mol L^{-1}) em acetonitrila
Comprimento de onda	200 nm
Modo e tempo de injeção	Hidrodinâmico 10 s a 6,9 mbar
Pré-condicionamento	2 min NaOH 1 mmol L^{-1} 2 min H2O 2 min eletrólito de separação

3.2.3 Otimização do processo SBSE

Para obtenção de um processo eficiente de SBSE várias variáveis foram otimizadas. A primeira variável foi a influência do pH da amostra. Para essa finalidade, as amostras de plasma enriquecidas com os antidepressivos foram diluídas em solução borato (0,05 mol L^{-1}) em cinco diferentes valores de pH: 7,0; 8,0, 9,0; 10,0 e 11,0.

Para a extração dos fármacos, a barra PDMS foi inserida em um frasco de pirex (15 mL), contendo 800 µL de plasma enriquecido com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL^{-1} e 4 mL da solução tampão. A extração foi realizada à temperatura de 50 ^{o}C com agitação magnética de 1000 rpm por 45 minutos. Após o processo de extração, a barra de agitação foi retirada do frasco com o auxílio de uma pinça e ligeriamente seca em lenço de papel, antes da dessorção dos solutos.

Os tempos de extração de 15, 30, 45 e 60 mintuos foram avaliados concomitantemente às variações de temperatura de 38, 50, 60, e 70 ^{o}C.

Para a dessorção dos fármacos, a barra de PDMS foi colocada em um frasco contendo solvente orgânico. Esse processo foi realizado a 50 ^{o}C e sob agitação de 1000 rpm. O tempo de dessorção foi avaliado em diferentes intervalos de 15, 30, 45 e 60 minutos. O extrato resultante foi evaporado à secura e ressupenso com 50µL de acetonitrila.

3.2.4 Validação analítica do método SBSE/NACE-UV para análise simultânea de antidepressivos

O método SBSE/NACE-UV foi validado segundo normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Conforme já mencionado anteriormente.

3.3. Determinação de antidepressivos ISRSs em amostras de plasma por micro extração em sorvente empacotado e eletroforese capilar em meio não aquoso (MEPS/NACE)

3.3.1. Condições de análise MEPS/CE-UV

Para as análises após extração com MEPS, as mesmas condições eletroforéticas foram mantidas (descritas anteriormente nas análises SBSE/NACE).

3.3.2. Pré-preparo da amostra biológica

As amostras de plasma foram diluídas com solução tampão para minimizar o efeito da matriz. Assim, em 400 μL de plasma foram adicionados a 400 μL de solução tampão (50 mmol L^{-1}).

As soluções tampão de fosfato (pH 4,0; 5,5; 7,0 e 9,0) e solução borato pH 9) foram avaliadas.

3.3.3 Procedimento MEPS

A otimização das variáveis MEPS foi realizada, em triplicata, com amostras de plasma enriquecidas com solução padrão dos antidepressivos (500 ng mL^{-1}).

A microsseringa MEPS de 250 μL e sorvente de fase mista: C8/trocador de cátions, 2 mg, foi doada pela SGE (Melbourne, Austrália). Este sorvente

possui partículas com uma média de tamanho de 50 μm e porosidade nominal de 60 A.

Antes de usar o sorvente pela primeira vez, o mesmo foi condicionado manualmente com 250 μL de metanol, seguido de 250 μL de água. Posteriormente, a amostra de plasma enriquecida com solução dos fármacos foi diluída com solução tampão e manualmente aspirada através do sorvente e dispensada no mesmo frasco uma ou mais vezes (pré- concentração dos analitos). A fase sólida foi lavada uma vez com 100 μL de ácido fórmico 0,1% em água para remover proteínas e outros compostos interferentes. A dessorção foi efetuada com 150 μL de eletrólito de separação em um único ciclo. O solvente foi evaporado sob um fluxo de nitrogênio e ao resíduo foi adicionado 50 uL de acetonitrila. O antidepressivo mirtazapina (1 μL) foi adicionado às amostras como padrão interno.

O sorvente foi usado para múltiplas extrações. Para aumentar o tempo de vida da fase extratora, esta foi lavada 3 vezes com 250 μL de água seguido por 250 μL de solução aquosa de ácido fórmico (0,1%) e 250 μL de metanol, entre as extrações. Esta etapa permitiu, além da minimização do efeito de memória, o condicionamento do sorvente para a extração seguinte.

A influência do pH da amostra na eficiência do processo MEPS foi avaliada e para isso, diferentes valores de pH foram investigados: 4,0; 5,5; 7,0 e 9,0 com soluções tampão adequadas.

O volume de amostra aspirar-dispensar (50, 100 e 250 μL) e o número de ciclos aspirar-dispensar também foram avaliados para assegurar adequada eficiência do processo MEPS.

A dessorção dos analitos foi realizada em uma única etapa com 150 μL de tampão fosfato 50 mmol L^{-1} pH 4,5 e metanol (v/v 55:45).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação de antidepressivos ISRSs em amostras de plasma por extração líquido-líquido e eletroforese capilar em meio não aquoso (LLE/NACE)

4.1.1. Otimização da separação eletroforética

4.1.1.1. Avaliação de diferentes soluções de eletrólito em meio aquoso

Os fármacos estudados apresentam um grupo amino que pode ser protonado empregando-se um tampão ácido. Por esta razão, várias soluções tampão com diferentes valores pH foram avaliadas, para obter resolução adequada na separação simultânea dos quatro antidepressantes.

Em valores de pH mais ácidos, os antidepressivos migraram em direção ao detector como íons positivamente carregados de acordo com a razão massa/carga. A Tabela 6 mostra os valores de pKa e massas moleculares.

Tabela 6. Valores de pKa e massas moleculares dos antidepressivos [125].

Antidepressivos	Massa molecular	pKa
Fluoxetina	309,30	8,7
Citalopram	324,39	9,5
Sertralina	308,25	9,5
Paroxetina	329,36	9,9

Para a obtenção de adequada resolução dos fármacos, foram avaliados as soluções tampão de fosfato de sódio (pH 2,0 a 3,2), acetato de amônio (pH 3,7 a 5,7), acetato de sódio (pH 3,7 a 5,7), formiato de amônio (pH 2,7 a 4,7) e formiato de sódio (pH 2,7 a 4,7). As análises foram realizadas variando-se o pH das soluções tampão em 0,2 unidades, considerando as faixas de tamponamento . A Figura 10 apresenta alguns resultados obtidos nas diferentes soluções tampão avaliadas.

O pH teve grande influência na separação desses antidepressivos. No entanto, adequada resolução dos analitos não foi obtida com a variação deste parâmetro. O tamanho e forma dos analitos são os principais fatores que governam a mobilidade eletroforética. A co-migração dos analitos pode ser atribuída à similaridade do tamanho molecular (ou massa molecular) e geometria molecular [126].

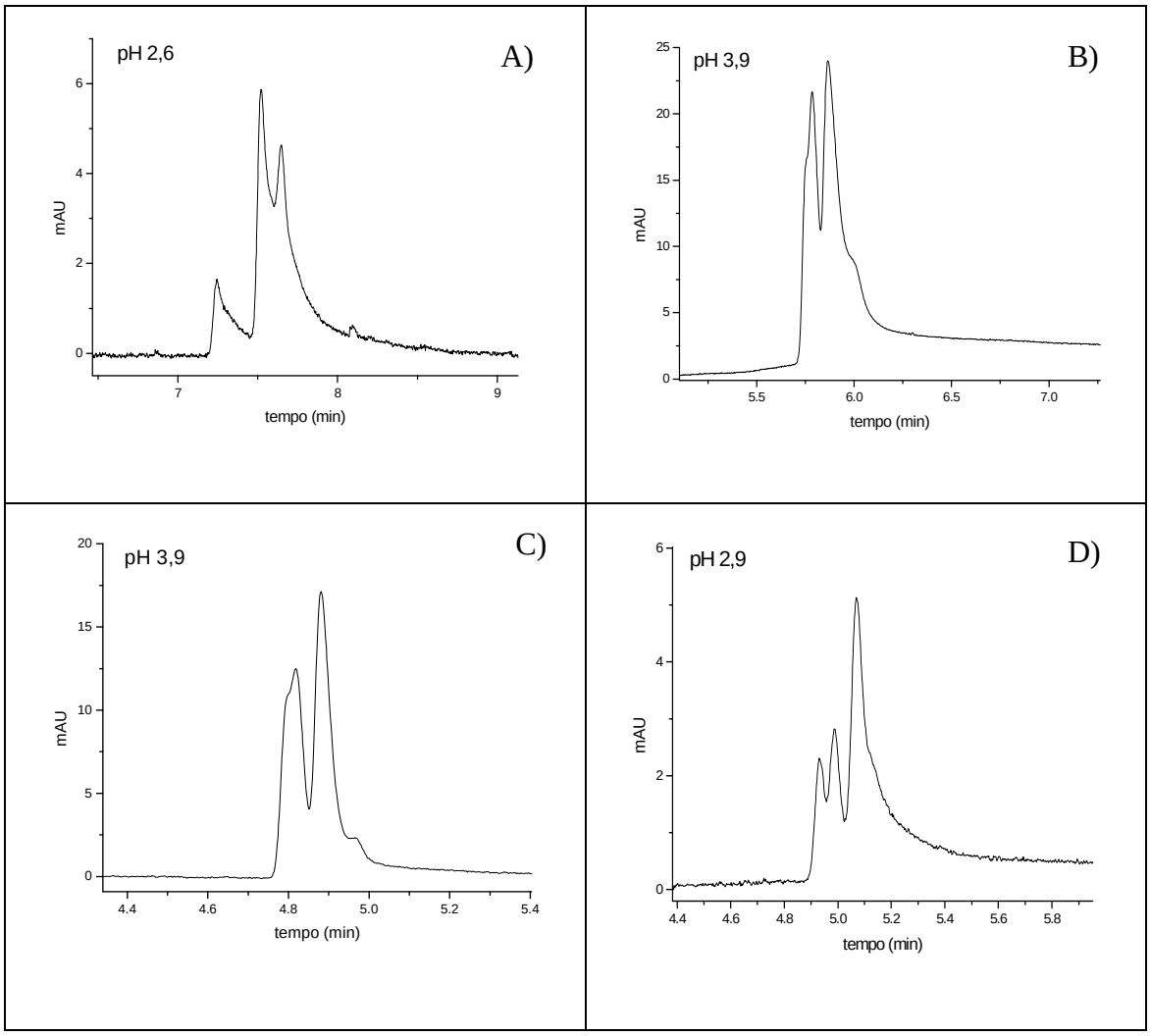


Figura 10. Eletroferogramas obtidos da análise dos antidepressivos em: A) tampão fosfato de sódio; B) tampão acetato de amônio; C) tampão acetato de sódio e D) tampão formiato de sódio.

Empregando-se o tampão formiato, observou-se uma grande melhora na separação dos analitos, em comparação às separações obtidas em soluções tampão de fosfato e de acetato. Diferentemente dos demais resultados, em tampão formiato de amônio, nos valores de pH 2,7, 2,9 e 3,1, e em solução tampão de acetato de amônio em pH 3,7 observou-se a separação dos 4 fármacos. No entanto, os antidepressivos continuaram co-migrando.

A Figura 11 ilustra o melhor eletroferograma obtido, dentre os avaliados, para a separação simultânea dos antidepressivos em solução tampão formiato de amônio na concentração 50mM e em pH de 2,9.

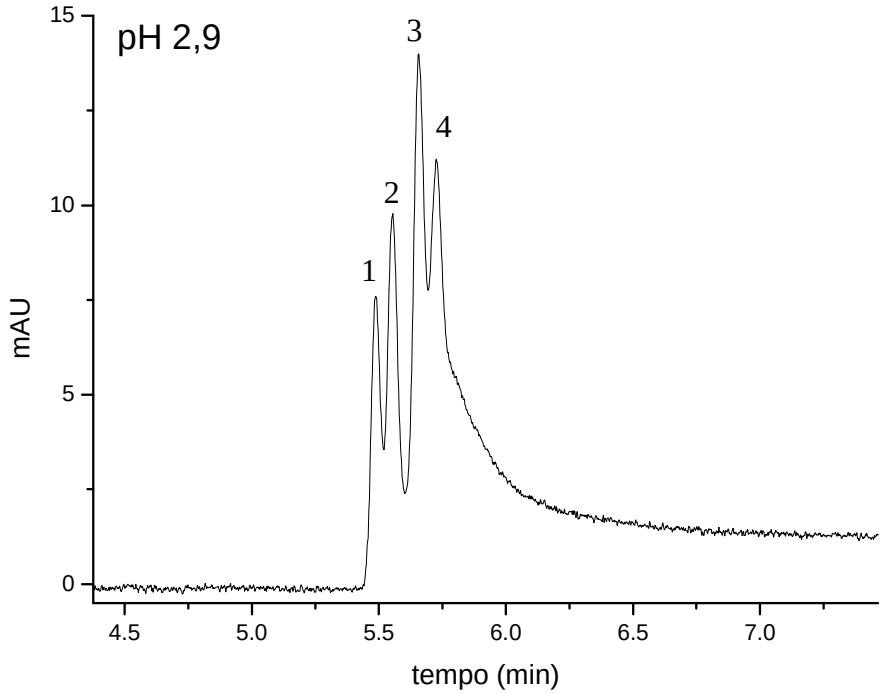


Figura 11. Eletroferograma obtido da análise dos antidepressivos em solução tampão formiato de amônio 50 mM em pH 2,9. Tempo de injeção 2 s a 6,9 mbar e campo elétrico de 300 V/cm. Ordem de migração dos antidepressivos: 1º) sertralina; 2º) paroxetina; 3º) fluoxetina e 4º) citalopram.

A ordem de migração dos analitos pode ser claramente visualizada na Figura 12, onde cada analito foi analisado separadamente em solução tampão formiato de amônio em pH 2,9. Pode-se observar que os antidepressivos paroxetina e sertralina apresentaram próximas velocidades de migração.

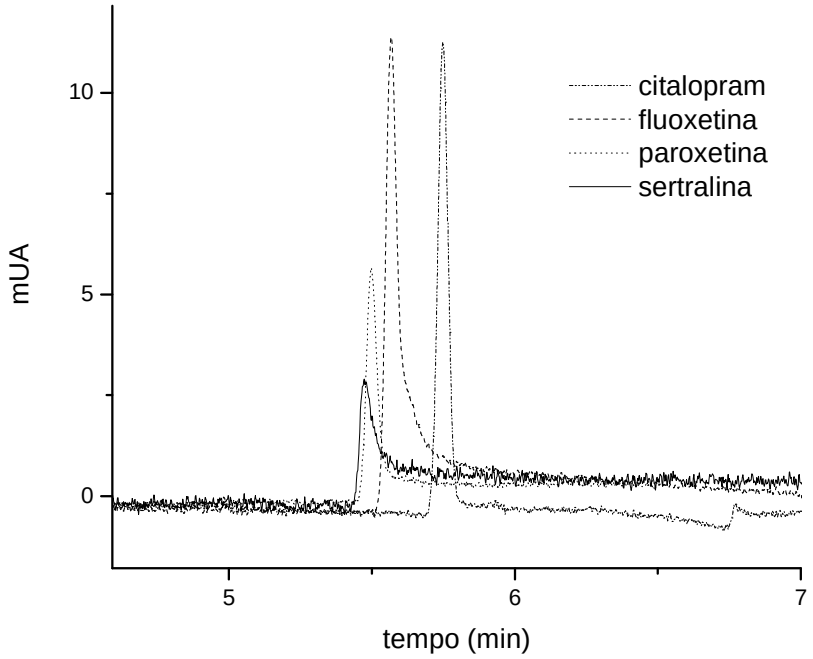


Figura 12. Eletroferogramas dos antidepressivos analisados separadamente em solução tampão formiato de amônio 50 mM pH 2,9. Tempo de injeção 2 s a 6,9 mbar e campo elétrico de 300 V/cm.

A Figura 13 ilustra os valores da resolução eletroforética dos fármacos em solução tampão formiato de amônio 50 mM em diferentes valores de pH (2,7 a 4,1).

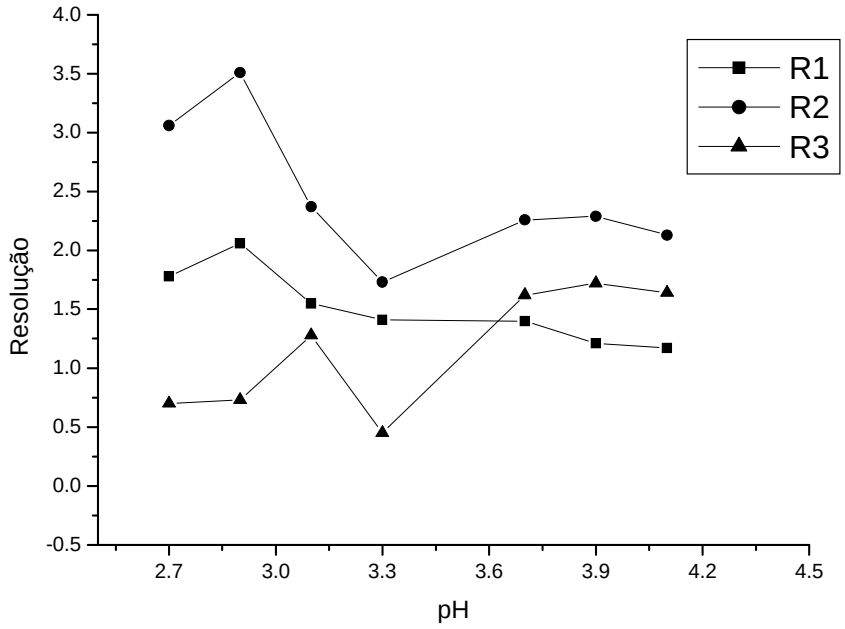


Figura 13. Resolução eletroforética dos fármacos em solução tampão formiato de amônio 50 mM em diferentes valores de pH (2,7 a 4,1). R1 corresponde à resolução entre os picos 1(sertralina) e 2 (paroxetina); R2 corresponde à resolução entre os picos 2 (paroxetina) e 3(fluoxetina); e R3 corresponde à resolução entre os picos 3(fluoxetina) e 4 (citalopram).

A concentração da solução tampão de formiato de amônio em pH 2,9 foi também otimizada. A Figura 14 ilustra os valores das resoluções determinadas para as separações dos fármacos em solução tampão formiato de amônio pH 2,9 em diferentes concentrações (20 a 100 mM). Pode-se observar que a solução tampão de formiato de amônio pH 2,9 na concentração de 40 mM apresentou os melhores valores de resolução para os fármacos.

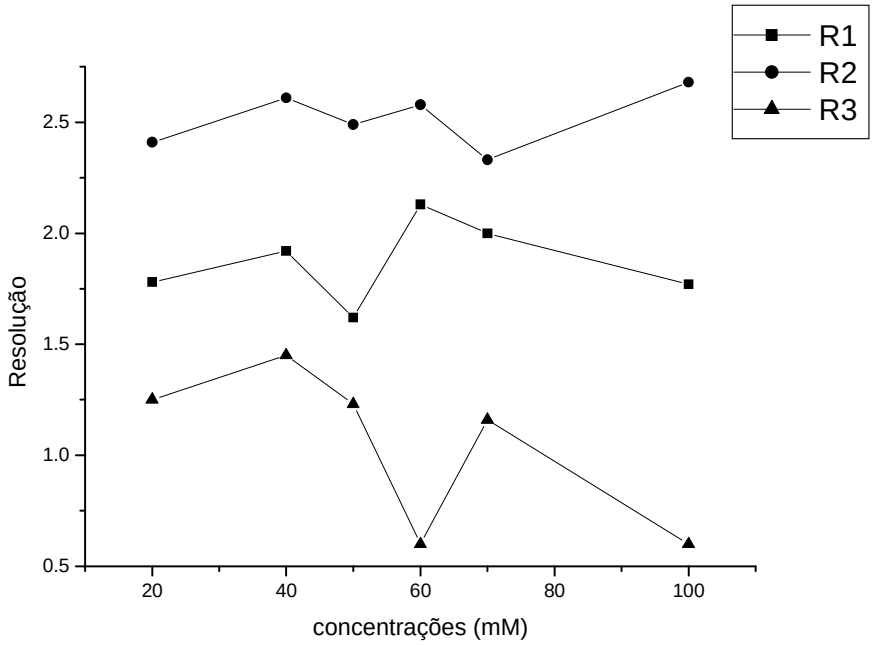


Figura 14. Valores de resolução para as separações dos fármacos em solução tampão formiato de amônio pH 2,9 em diferentes concentrações (20 a 100 mM). R1 corresponde à resolução entre os picos 1(sertralina) e 2 (paroxetina); R2 corresponde à resolução entre os picos 2 (paroxetina) e 3(fluoxetina); e R3 corresponde à resolução entre os picos 3(fluoxetina) e 4. (citalopram).

A Figura 15 ilustra a melhor separação eletroforética obtida em solução tampão de formiato de amônio 40 mM, pH 2,9. No entanto, esta condição eletroforética não resultou em satisfatória separação dos antidepressivos.

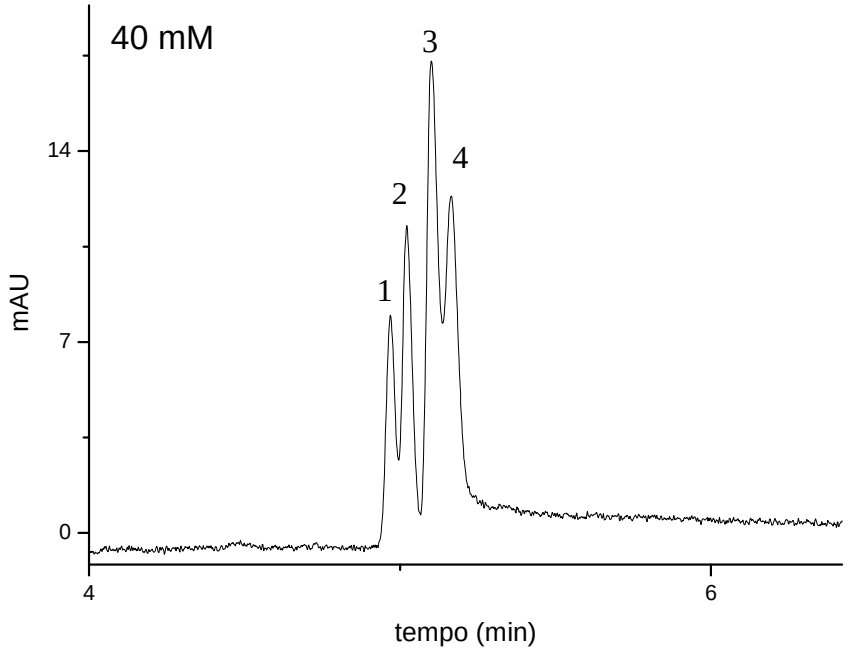


Figura 15. Eletroferograma obtido em solução tampão formiato de amônio 40 mM em pH 2,0. Tempo de injeção 2 s a 6,9 mbar e campo elétrico de 300 V/cm. Ordem de migração dos antidepressivos: 1º) sertralina; 2º) paroxetina; 3º) fluoxetina e 4º) citalopram.

4.1.1.2. Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC)

Tendo como base o artigo de Pucci et al. [127], a técnica de cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) foi avaliada com o eletrólito fosfato de sódio com valor de pH relativamente alto, de maneira a proporcionar fluxo eletroosmótico forte, transportando assim os analitos na direção do cátodo.

A Figura 16 ilustra o eletroferograma obtido para os antidepressivos utilizando-se a técnica de cromatografia eletrocinética micelar (MEKC).

Contudo, mesmo nessas condições não foi possível a separação simultânea de todos os antidepressivos.

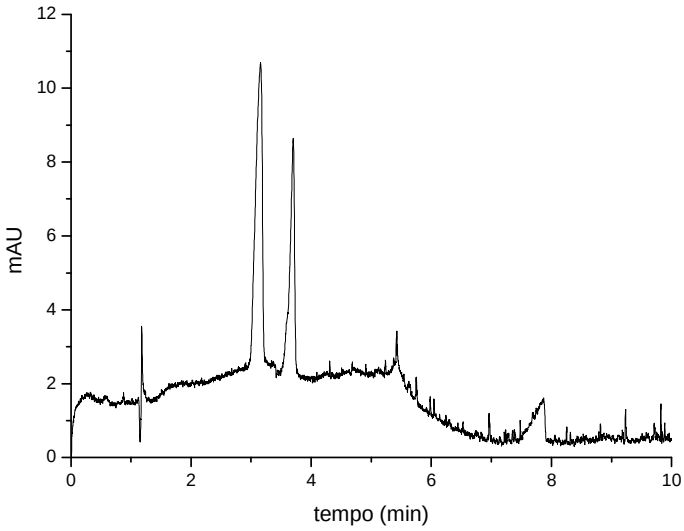


Figura 16. Eletroferograma da análise MEKC dos quatro antidepressivos utilizando-se o eletrólito fosfato de sódio 25 mM pH 7,5, dodecil sulfato de sódio 20 mM e 30% de metanol. Condições de análise tempo de injeção 10 segundos a 6,9 mbar e campo elétrico de 387,6 V/cm com polaridade inversa. Pico 1 corresponde ao citalopram e paroxetina; pico 2 corresponde à fluoxetina e sertralina.

Como a separação satisfatória dos quatro antidepressivos não foi obtida nas condições descritas, decidiu-se então avaliar um sistema não-aquoso, a eletroforese capilar em meio não aquoso .

4.1.1.3. Eletroforese capilar em meio não aquoso (NACE)

Avaliação de diferentes soluções de eletrólito

Dando continuidade à otimização da separação eletroforética, a NACE foi avaliada em diferentes concentrações de acetato de amônio (10 a 100 mM), mas mantendo-se constante a concentração de ácido acético (2 mM) em acetonitrila.

Pode-se observar que o aumento da concentração de acetato de amônio favoreceu a resolução dos antidepressivos, entretanto aumentou o tempo de análise, em razão da redução do fluxo eletrosmótico. O aumento da concentração de acetato de amônio aumentou a força iônica do meio, fato verificado pelo aumento da corrente nas análises NACE, causando redução na dupla camada elétrica. Consequentemente, o potencial zeta diminui, resultando em decréscimo no fluxo eletroosmótico [128].

As melhores condições, entre as avaliadas, para a análise dos antidepressivos em amostras de plasma, foram as seguintes: 100 mM acetato de amônio, 2 M ácido acético em acetonitrila; tempo de injeção 2 s a 6,9 mbar, campo elétrico 478 V/cm, capilar de 75 µm de diâmetro interno e comprimento total de 41,8 cm, detecção em 200 nm.

A Figura 17 apresenta o eletroferograma obtido em meio não aquoso para separação dos quatro antidepressivos. Podemos observar que a separação dos quatro antidepressivos foi obtida com adequada resolução em meio não aquoso.

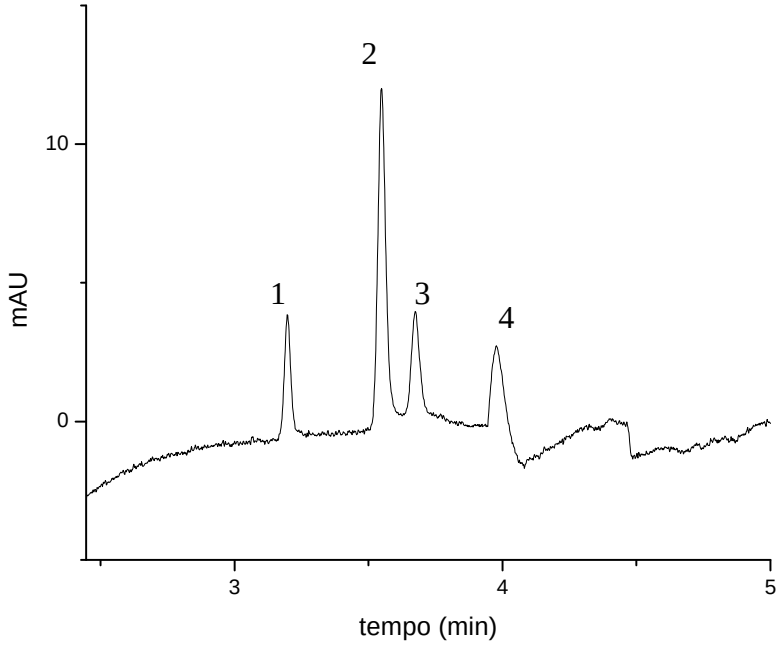


Figura 17. Eletroferograma da análise NACE dos quatro antidepressivos em meio não aquoso. Condições: 100 mM acetato de amônio, 2 M ácido acético em acetonitrila; tempo de injeção 2s a 6,9 mbar, campo elétrico 478 V/cm. (1) sertralina; (2) fluoxetina; (3) citalopram e (4) paroxetina.

Embora tenha obtido separação satisfatória dos quatros antidepressivos em solução de acetato de amônio e ácido acético em acetonitrila, novos experimentos foram realizados utilizando-se o eletrólito ácido fosfórico (0,50 a 1,75 mol L^{-1}) em acetonitrila, para se obter uma separação com melhor resolução eletroforética.

A Figura de 18 ilustra os eletroferogramas obtidos para as separações dos antidepressivos em diferentes concentrações de ácido fosfórico em acetonitrila. Nestas condições, pôde-se observar que o aumento da

concentração de ácido fosfórico de 0,50 a 1,25 mol L^{-1} favoreceu a separação (resolução) dos antidepressivos. Entretanto, em concentrações molares de ácido fosfórico maiores que 1,25 mol L^{-1} observou-se o alargamento dos picos, diminuindo a eficiência da separação dos antidepressivos. Portanto, a concentração de 1,25 mol L^{-1} de ácido fosfórico foi selecionada como valor ótimo para os experimentos posteriores. Pôde-se observar também que com a troca de eletrólito de separação, mudou a ordem de migração dos analitos. Fato este que pode ser explicado pela diferença de ionização das espécies.

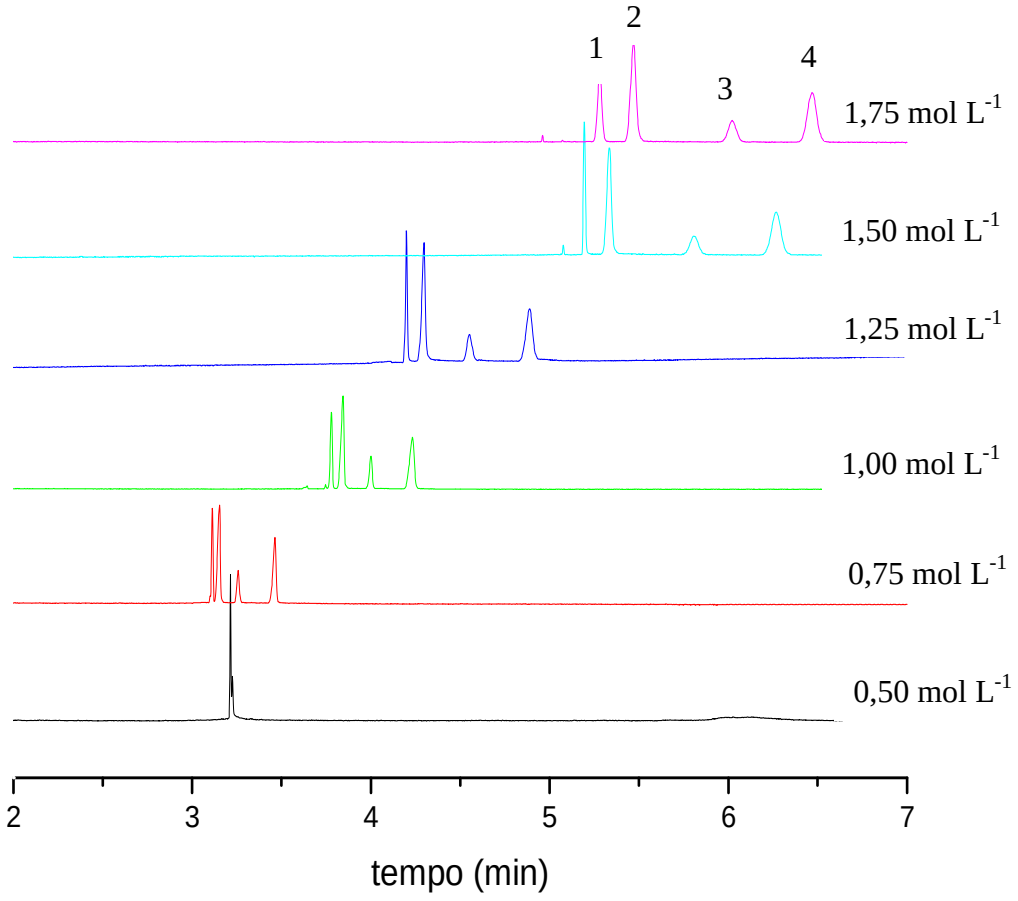


Figura 18. Eletroferogramas obtidos nas análises dos antidepressivos em diferentes concentrações de ácido fosfórico em acetonitrila. Condições de análise: injeção 10 s a 6,9 mbar; campo elétrico 300 V cm-1. Ordem de migração dos antidepressivos: 1º) sertralina; 2º) fluoxetina; 3º) citalopram e 4º) paroxetina.

Otimização do campo elétrico

A Figura 19 ilustra os eletroferogramas obtidos nas análises dos antidepressivos variando-se o campo elétrico de separação (300 V/cm –

600 V/cm). Observou-se que o aumento na tensão aplicada aumentou a eficiência da separação dos fármacos de interesse.

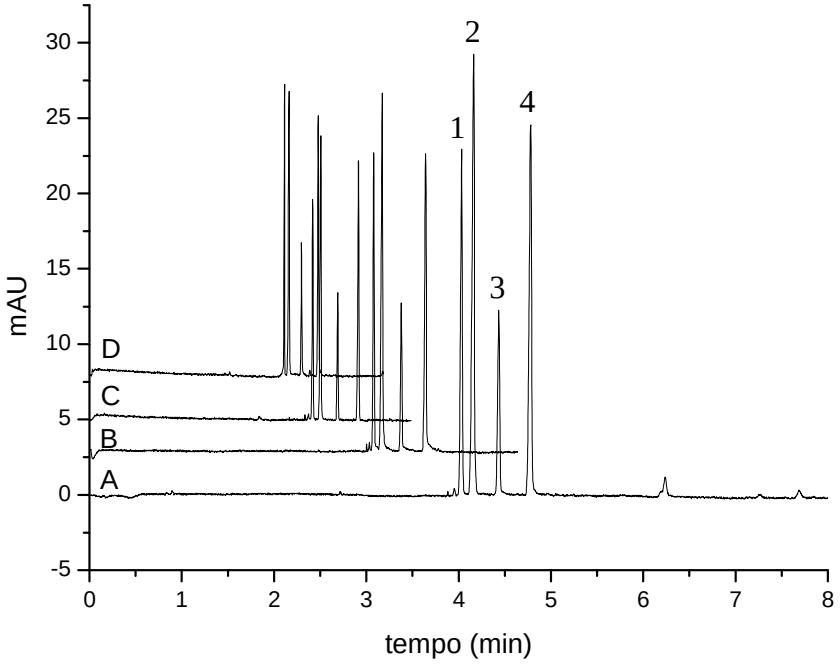


Figura 19. Eletroferogramas obtidos da análise dos quatro antidepressivos em meio não-aquoso de ácido fosfórico 1,25 mol L^{-1} em acetonitrila variando-se o campo elétrico: A) 300 V/cm; B) 400 V/cm; C) 500 V/cm e D) 600 V/cm. Condições de análise: injeção 10 s a 6,9 mbar. Ordem de migração dos antidepressivos: 1º) sertralina; 2º) fluoxetina; 3º) citalopram e 4º) paroxetina.

A Figura 20 apresenta o gráfico de Ohm traçado para a solução de ácido fosfórico (1,25 mol L^{-1}) em acetonitrila. O campo elétrico máximo que pode ser aplicado utilizando-se esta solução é de 500 V/cm. Acima desse valor há um aumento da temperatura no interior do capilar resultando na diminuição da

viscosidade da solução. Como conseqüência, ocorre o alargamento dos picos, tempos de migração irreprodutíveis, decomposição da amostra e descontinuidade da corrente elétrica através do capilar [101].

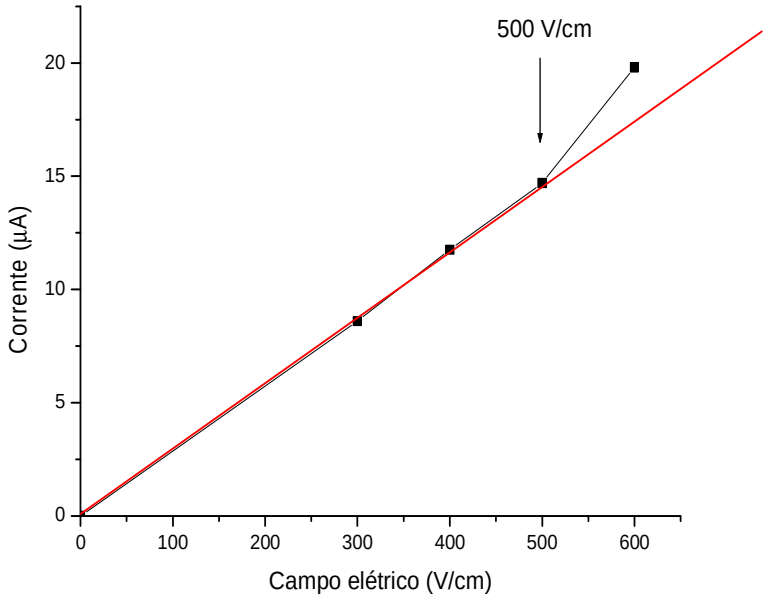


Figura 20. Gráfico de Ohm obtido para a solução de ácido fosfórico (1,25 mol L^{-1}).

As melhores condições eletroforéticas, entre as avaliadas, para a análise dos antidepressivos (citalopram, paroxetina, fluoxetina e sertralina) em amostras de plasma, empregando a técnica NACE-UV foram as seguintes: eletrólito de separação com 1,25 mol L^{-1} de ácido fosfórico em acetonitrila, injeção hidrodinâmica 10 s a 6,9 mbar, campo elétrico de 500 V/cm e λ=200 nm.

4.1.2. Validação analítica do método LLE/NACE-UV para a determinação dos ISRSs em amostras de plasma

4.1.2.1 Seletividade

A seletividade do método LLE/NACE foi demonstrada pelos eletroferogramas representativos (Figura 21) das análises de amostra de plasma branco de referência e amostra de plasma branco de referência enriquecida com antidepressivos na concentração de 500 ng mL^{-1}. Estes eletroferogramas ilustram a capacidade do método em quantificar os antidepressivos na presença de compostos endógenos do plasma, ou seja, nos tempos de migração dos analitos não foram observados picos interferentes. Amostras de plasma de diferentes procedências foram avaliadas.

Os sinais analíticos dos possíveis interferentes foram inferiores a 20% do sinal analítico dos fármacos em concentração que representam o limite de quantificação.

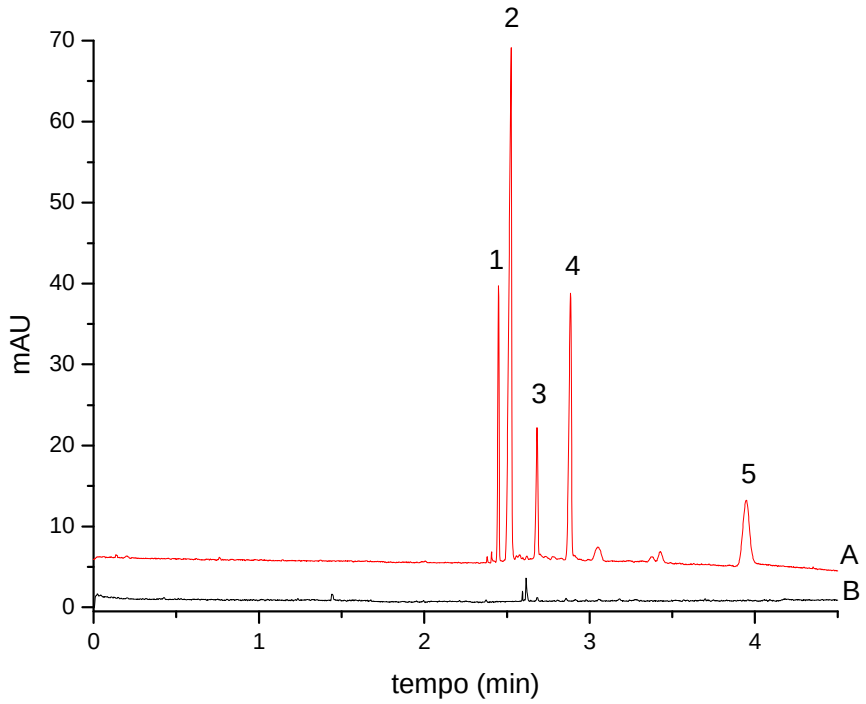


Figura 21. Eletroferogramas LLE/NACE. A) amostra de plasma branco de referência enriquecida com os fármacos na concentração de 500 ng mL^{-1}. B) amostra de plasma branco de referência. (1) Sertralina, (2) fluoxetina, (3) citalopram, (4) paroxetina e (5) mirtazapina, como padrão interno. Condições de análise: injeção 10 s a 6,9 mbar; campo elétrico 500 V cm^{-1}, eletrólito de separação: ácido fosfórico 1,25 mol L^{-1} em acetonitrila.

4.1.2.3 Linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e recuperação relativa

Os valores de LOQ foram determinados como concentrações plasmáticas que resultaram em sinal analítico 10 vezes maior que o do ruído da linha de base; e precisão analítica com desvio padrão relativo (RSD) inferior a

20%. Os valores de LOD foram estipulados como sendo as menores concentrações dos antidepressivos que resultaram em sinais analíticos 3 vezes superior ao ruído da linha de base. A tabela 6 apresenta os valores de LOQ e LOD obtidos para o método LLE/NACE para os quatro fármacos.

Os coeficientes de correlação (r) e equações das curvas analíticas no intervalo de concentração plasmática de LOQ a 500 ng mL^{-1} estão apresentados na Tabela 7. Os coeficientes de correlação, obtidos pelo método dos mínimos quadrados, para avaliação da linearidade do método foram maiores que 0,99, ou seja, o método apresentou linearidade na faixa de concentração LOQ a 500 ng mL^{-1}. Os coeficientes de correlação obtidos são condizentes com os critérios preconizados pela ANVISA que estabelecem como aceitáveis coeficientes de correlação igual ou superior a 0,980 para métodos bionalíticos.

Os valores de recuperação relativa para os analitos ficaram em torno de 90% (Tabela 7). Como preconizado pela ANVISA, as porcentagens de recuperação próximas a 100% são desejáveis, porém, admitem-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata.

Tabela 7. Parâmetros de validação analítica do método LLE/NACE padronizado para análise simultânea dos antidepressivos em amostras de plasma.

Fármaco	Linearidade LOQ – 500 ng mL^{-1}			LOD (ng mL^{-1})	LOQ (ng mL^{-1})	Recuperação (%)
	Inclinação	Intersecção	r			
Sertralina	$6,21 \times 10^{-4}$	0,0024	0,9980	10	20	92
Fluoxetina	$3,7 \times 10^{-3}$	0,0554	0,9981	5	15	91
Citalopram	$2,23 \times 10^{-4}$	-0,0027	0,9990	15	30	93
Paroxetina	$9,07 \times 10^{-4}$	-0,0042	0,9966	10	20	93

Os ensaios de precisão intra-ensaio e interensaio apresentaram valores RDS menores que 10 % para todas as concentrações avaliadas (50, 150 e 500 ng mL-1), como apresentados na Tabela 8.

Segundo as normas da ANVISA, o desvio não deverá exceder 15%, exceto par o LQ, para o qual se admitem valores menores ou iguais a 20%.

A exatidão avaliada em três diferentes níveis de concentração apresentou valores próximos à 100% (Tabela 8).

Tabela 8. Precisão e exatidão do método LLE/NACE padronizado para a análise simultânea dos antidepressivos em amostras de plasma, n=5.

Antidepressivos	**Concentração adicionada (ng mL^{-1})**	**Precisão intra-ensaio RDS (%)**	**Precisão inter-ensaio RDS (%)**	**Exatidão (%)**
Sertralina	50	8,1	9,0	94
	200	4,7	7,1	97
	500	1,3	4,2	100
Fluoxetina	50	8,2	8,8	95
	200	5,9	7,8	96
	500	2,0	3,2	98
Citalopram	50	7,8	9,4	97
	200	6,2	6,9	97
	500	2,8	5,1	101
Paroxetina	50	8,5	10,3	96
	200	5,2	7,8	98
	500	3,0	5,4	99

Para avaliar a eficiência do método proposto para fins de monitorização terapêutica, o protocolo descrito foi aplicado na análise de amostras de plasma de quatro diferentes pacientes idosos em terapia com os antidepressivos. A Figura 22 apresenta os eletroferogramas de amostras de plasma de pacientes em terapia com os antidepressivos.

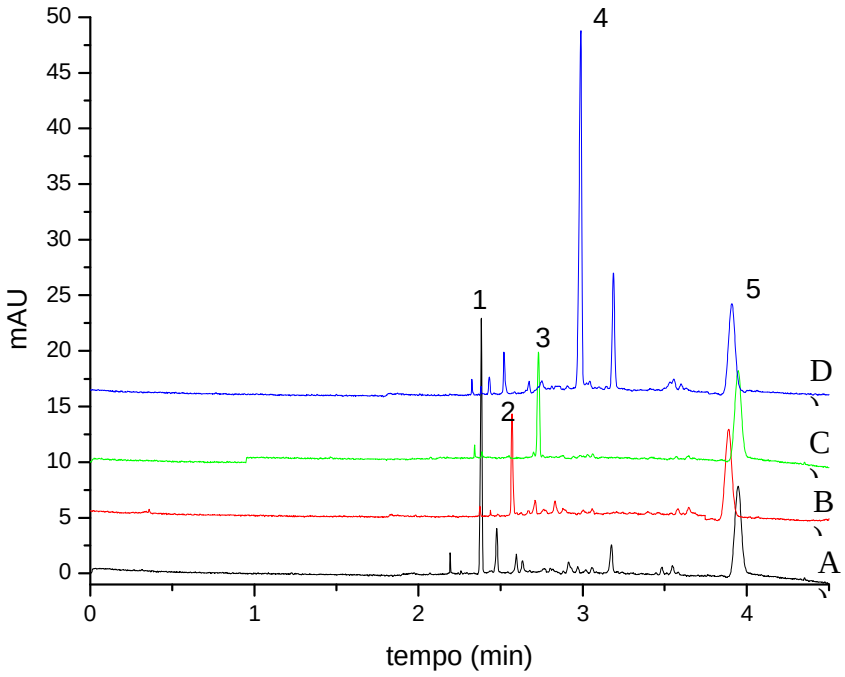


Figura 22. Eletroferogramas LLE/NACE de amostras de plasma de pacientes em terapia com os antidepressivos. Concentrações determinadas A) (1) Sertralina (215 ng mL^{-1}); B) (2) fluoxetina (22 ng mL^{-1}); C) (3) citalopram (284 ng mL^{-1}); D) (4) paroxetina (313 ng mL^{-1}) e (5) padrão interno. Condições de análise: injeção 10 s a 6,9 mbar; campo elétrico 500 V cm^{-1}, eletrólito de separação: ácido fosfórico 1,25 mol L^{-1} em acetonitrila.

Desta forma, baseado nos parâmetros de validação avaliados e nos eletroferogramas (Figura 22), o método LLE/NACE-UV padronizado poderá ser empregado para fins de monitorização terapêutica de pacientes em tratamento com os antidepressivos (sertralina, fluoxetina, citalopram e paroxetina).

4.2 Determinação de antidepressivos ISRSs em amostras de plasma por extração sortiva em barra de agitação e eletroforese capilar em meio não aquoso (SBSE/NACE)

4.2.1 Padronização do método SBSE/NACE-UV para análise simultânea de antidepressivos

As variáveis pH, tempo e temperatura de extração e de dessorção foram otimizadas para obtenção de um processo eficiente de extração em menor tempo de análise. A otimização das variáveis SBSE foi baseada no equilíbrio de sorção (partição) dos fármacos entre a fase polimérica (PDMS) e matriz biológica.

A espessura do revestimento do polímero, o volume da amostra e a velocidade de agitação influenciam o tempo de equilíbrio de extração [129], sendo assim, para a otimização do equilíbrio de sorção SBSE, essas variáveis foram mantidas constantes.

A otimização foi acompanhada por medidas de áreas dos picos do soluto em função das variáveis avaliadas.

4.2.2 Otimização do tempo e da temperatura de extração

Com o aumento da temperatura, o processo de difusão dos solutos da matriz aquosa para a fase polimérica é favorecido, resultando em menor tempo de extração. Contudo, tal aumento de temperatura também pode diminuir a constante de partição do fármaco entre o revestimento PDMS e a fase

aquosa [130]. Assim, encontrar a melhor temperatura, para um menor tempo de análise e sensibilidade analítica adequada é muito importante quando se utiliza a técnica SBSE.

Neste estudo as variáveis tempo (15 min a 60 min) e temperatura (38 a 70°C) de extração foram otimizadas concomitantemente (Figuras 23 a 27), com o objetivo de avaliar adequadamente a influência dessas variáveis no processo SBSE. Segundo os gráficos obtidos, as extrações realizadas em 45 minutos a 50°C apresentaram maior sensibilidade analítica para todos os antidepressivos avaliados.

De acordo com os resultados obtidos, o aumento da temperatura de 38 ^{o}C para 50 ^{o}C aumentou consideravelmente a sensibilidade analítica para todos os fármacos, porém a continuidade desse aumente na temperatura de 50 ^{o}C para 60 ^{o}C e posterimente 70 ^{o}C não apresentou o mesmo comportamento. As extrações realizadas na temperatura de 70 ^{o}C foram menos eficientes para todos os antidepressivos em estudo.

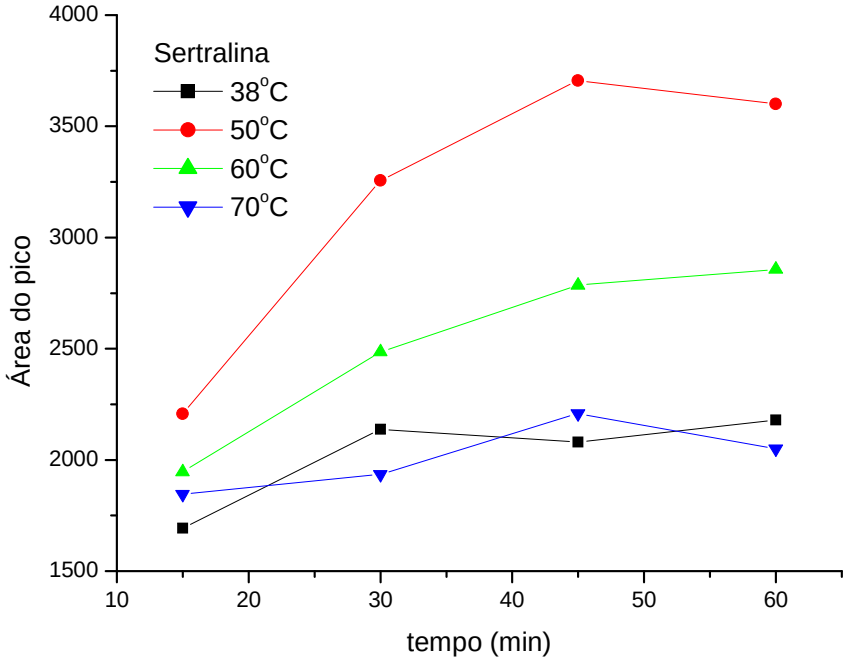


Figura 23. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para o antidepressivo sertralina. A amostra de plasma foi enriquecida com o antidepressivo (500 ng mL^{-1}) e diluída com solução tampão borato 0,05 mol L^{-1} pH 9,0. Condições eletroforéticas: eletrólito de separação 1,25 M de ácido fosfórico em acetonitrila; campo elétrico de 500 V cm^{-1}; injeção hidrodinâmica por 10 s 6,9 mbar.

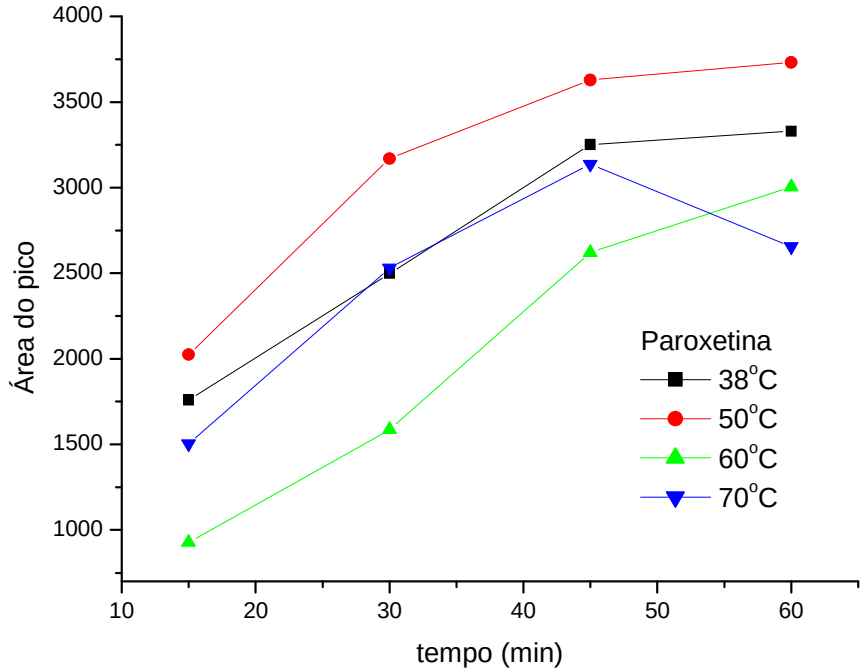


Figura 24. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para o antidepressivo paroxetina. A amostra de plasma foi enriquecida com o antidepressivo (500 ng mL^{-1}) e diluída com solução tampão borato 0,05 mol L^{-1} pH 9,0. Condições eletroforéticas: eletrólito de separação 1,25 M de ácido fosfórico em acetonitrila; campo elétrico de 500 V cm^{-1}; injeção hidrodinâmica por 10 s a 6,9 mbar.

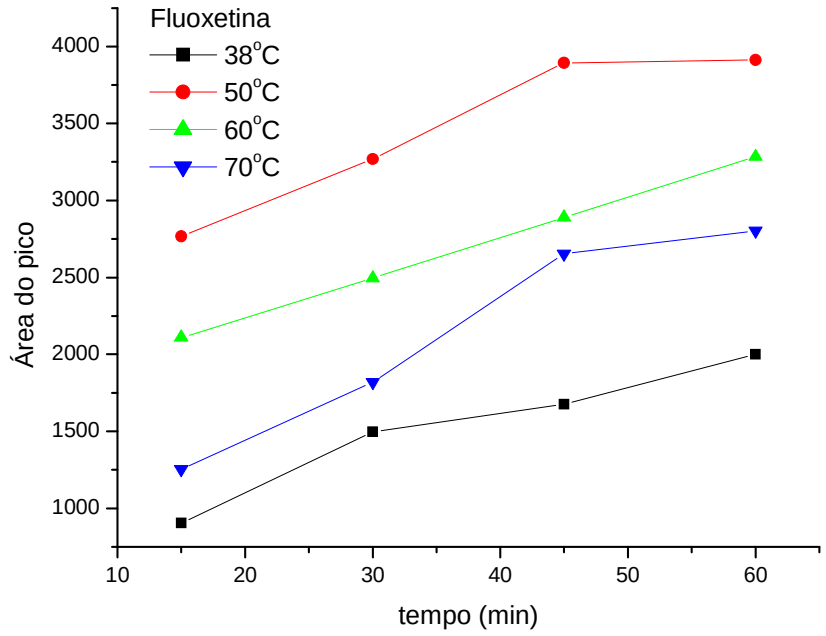


Figura 25. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para o antidepressivo fluoxetina. A amostra de plasma foi enriquecida com o antidepressivo (500 ng mL^{-1}) e diluída com solução tampão borato 0,05 mol L^{-1} pH 9,0. Condições eletroforéticas: eletrólito de separação 1,25 M de ácido fosfórico em acetonitrila; campo elétrico de 500 V cm^{-1}; injeção hidrodinâmica por 10 s a 6,9 mbar.

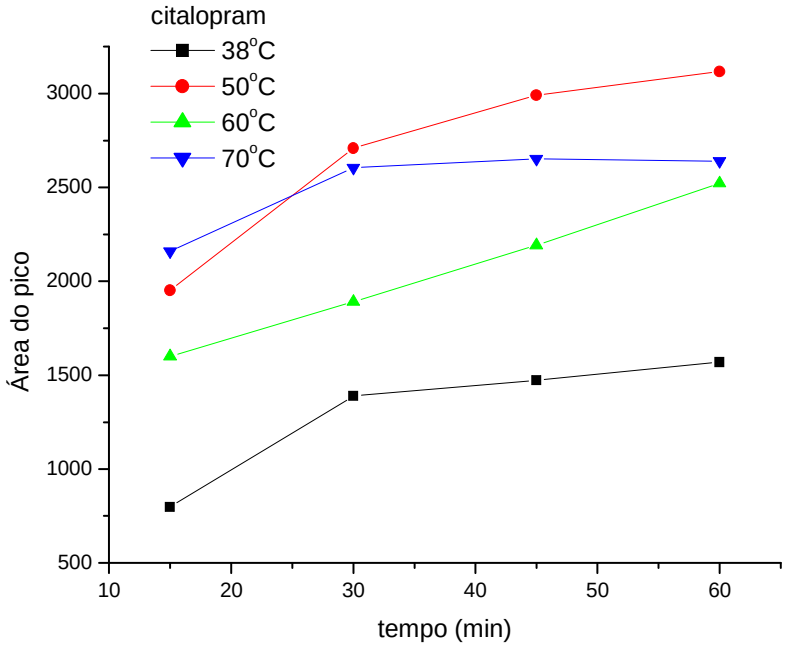


Figura 26. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para o antidepressivo citalopram. A amostra de plasma foi enriquecida com o antidepressivo (500 ng mL^{-1}) e diluída com solução tampão borato 0,05 mol L^{-1} pH 9,0. Condições eletroforéticas: eletrólito de separação 1,25 M de ácido fosfórico em acetonitrila; campo elétrico de 500 V cm^{-1}; injeção hidrodinâmica por 10 s a 6,9 mbar.

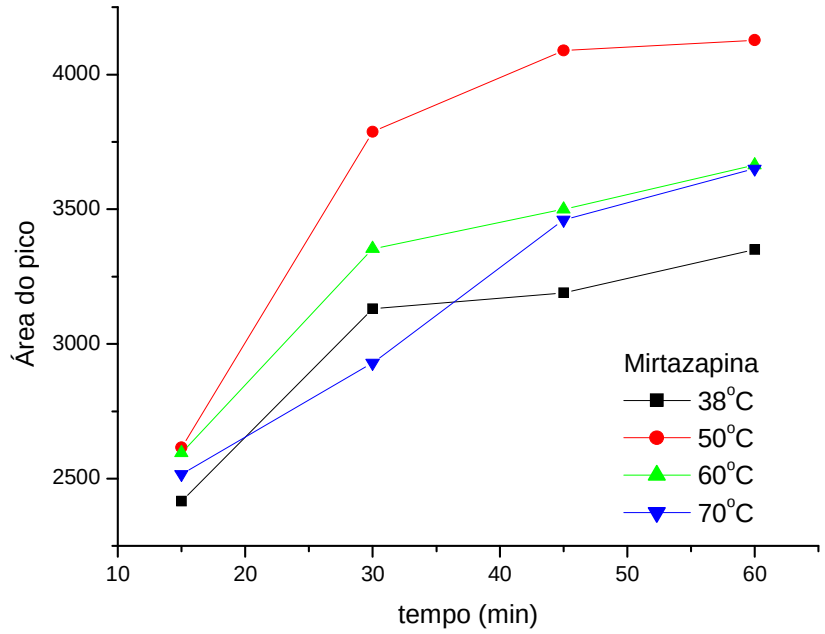


Figura 27. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para o antidepressivo mirtazapina. A amostra de plasma foi enriquecida com o antidepressivo (500 ng mL^{-1}) e diluída com solução tampão borato 0,05 mol L^{-1} pH 9,0. Condições eletroforéticas: eletrólito de separação 1,25 M de ácido fosfórico em acetonitrila; campo elétrico de 500 V cm^{-1}; injeção hidrodinâmica por 10 s a 6,9 mbar.

Para conservar a integridade físico-química das amostras, temperaturas superiores a 70 ^{o}C não foram avaliadas. Na temperatura de 38 ^{o}C, pode-se observar que o equilíbrio de sorção não foi atingido no intervalo de tempo avaliado para todos os antidepressivos estudados.

Os trabalhos escritos a seguir ilustram a influência das variáveis SBSE na eficiência do processo de extração, com destaque o tempo e temperatura de extração.

Bichhi e colaboradores [131] estudaram a influencia do $K_{o/W}$, o volume de amostra e o volume de fase extratora no tempo de extração utilizando três pesticidas. Os resultados obtidos pelos autores indicaram que para baixo volume de amostra empregando fases extratoras com 20, 40 e 110 μL de PDMS obteve-se boa correlação entre os valores estimados pelos valores de $K_{o/W}$. Contudo, com volumes grandes de amostra, 1 L e 5 L, essa correlação não foi observada. Para volumes pequenos de amostra (100 mL), o equilíbrio de sorção foi atingido em 6 h e para amostras de 1L, o equilíbrio foi observado após 24 h de extração.

Em estudos realizados por Stopforth e colaboradores [64] para análise de 4-hidroxinonenal em amostras de urina, observou-se que o aumento da temperatura acima de 50°C reduziu a eficiência de extração e aumento o tempo de análise.

Esses pesquisadores também avaliaram amostras [64] de testosterona e epitestosterona em pacientes HIV positivos, e observaram comportamento similar em relação ao aumento gradual da temperatura. Assim, empregando temperaturas acima de 50 ^{o}C, os resultados obtidos mostraram uma redução nas áreas dos picos para a epitestosterona e um aumento insignificante para a testosterona.

4.2.3 Influência do pH da amostra

O pH da matriz aquosa é um parâmetro muito importante na otimização do processo SBSE uma vez que os fármacos estudados apresentam grupos ionizáveis. O revestimento de polidimetilsiloxano (PDMS) extrai

preferencialmente solutos não iônicos [122]. Assim, o ajuste do pH da matriz biológica em valores nos quais, os fármacos encontram-se, na sua maior parte na forma não dissociada, resulta em extrações mais eficientes.

Na Figura 28 pode ser observado o efeito do pH da matriz biológica na eficiência de extração. Os valores de pH 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, e 11,0 foram selecionados de acordo com a faixa de pKa dos fármacos analisados.

De acordo com os resultados, a maioria dos antidepressivos estudados apresentou sensibilidade analítica satisfatória em solução tampão pH 9,0. Nesse valor de pH é possível também evitar a degradação da fase extratora, aumentando, assim a vida útil da barra SBSE.

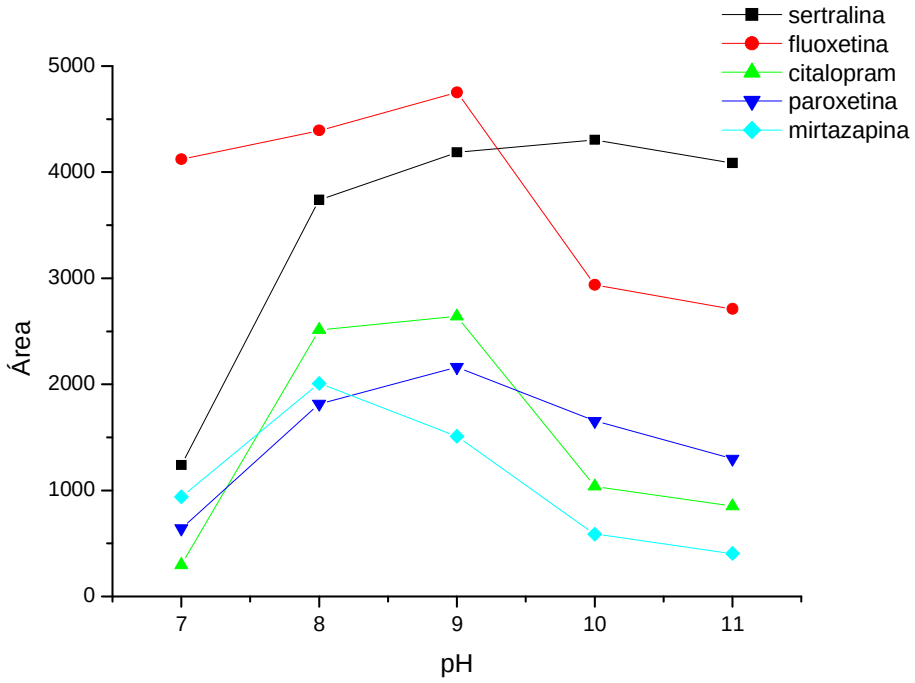


Figura 28. Influência do pH da matriz na eficiência do processo de extração em barra (SBSE). Amostra enriquecida com antidepressivos na concentração de 500 ng mL^{-1}. Condições eletroforéticas: eletrólito de separação 1,25 M de ácido fosfórico em acetonitrila; campo elétrico de 500 V cm^{-1}; injeção hidrodinâmica por 10 s a 6,9 mbar.

4.2.4 Tempo de Dessorção

O tempo de dessorção foi também otimizado neste estudo. Os princípios teóricos que regem o processo de dessorcao do soluto na fase extratora são os mesmos já descritos para o processo de sorção. O tempo e a temperatura de dessorção adequados são aqueles nos quais não se observa a presença de solutos no eletroferograma após o processo de dessorção, favorecendo, assim,

a repetitividade dos resultados. O efeito do tempo de dessorçao no processo SBSE é ilustrado na Figura 29.

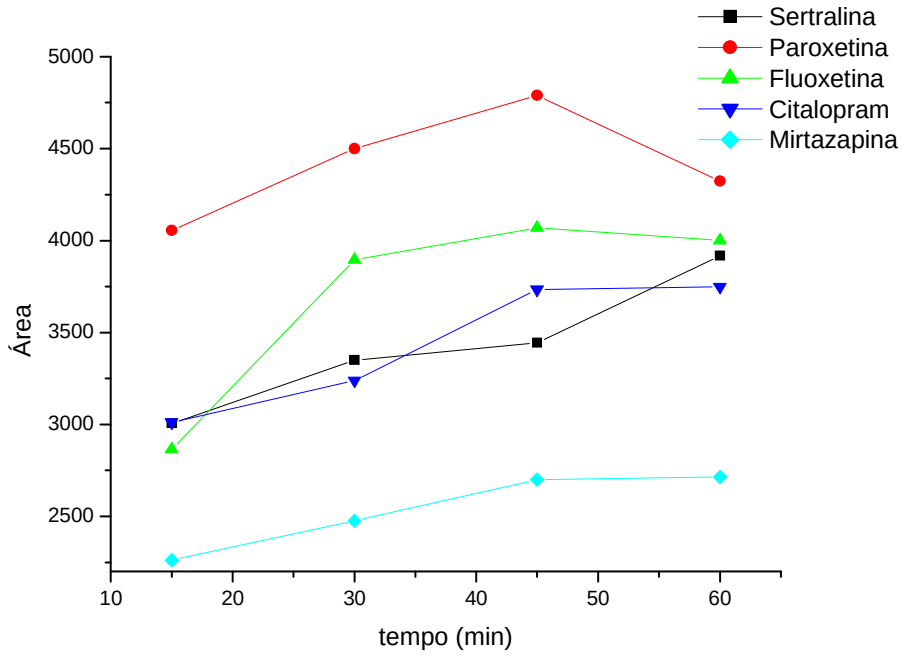


Figura 29. Influência do tempo de dessorção na eficiência do processo SBSE de extração em barra. Amostra enriquecida com antidepressivos na concentração de 500 ng mL^{-1}. Condições eletroforéticas: eletrólito de separação 1,25 M de ácido fosfórico em acetonitrila; campo elétrico de 500 V cm^{-1}; injeção hidrodinâmica por 10 s a 6,9 mbar.

Dentre os orgânicos avaliados para o processo de dessorção a mistura acetonitrila/metanol (60:40, v/v) apresentou as maiores taxas de extração.

Os resultados obtidos (Figura 29) mostram que os antidepressivos foram eficientemente dessorvidos após 45 min em 1 mL de acetonitrila/metanol

(60:40, v/v), a 50°C, com exceção do antidepressivo sertralina, cujo equilíbrio de dessorção não foi atingido no intervalo de tempo avaliado. Contudo, nessas condições de dessorção, o processo SBSE apresentou sensibilidade analítica satisfatória para todos os antidepressivos avaliados. Assim, o tempo de dessorção de 45 minutos foi selecionado para as análises posteriores. Após o processo de dessorção, não foi observado efeito de memória. Este efeito foi avaliado com análises de branco de referência.

Uma etapa de limpeza da barra extratora de PDMS em metanol a 50°C foi realizada entre as extrações durante 45 minutos. Este procedimento aumentou o tempo de utilização da barra de PDMS.

O uso dos solventes, acetonitrila e metanol, no processo de dessorção permitiu a evaporação do solvente e posterior ressuspensão do extrato obtido em acetonitrila, antecedendo a injeção destes no aparelho de eletroforese capilar.

De acordo com Sandra e colaboradores [132], as extrações SBSE podem ser realizadas fora do equilíbrio de absorção, conquanto que os valores das variáveis sejam rigorosamente controlados durante as extrações. Contudo, as variáveis neste estudo, foram otimizadas para se obter sensibilidade analítica adequada às análises dos antidepressivos no intervalo terapêutico.

Baseado na otimização das variáveis da SBSE, as condições, entre as avaliadas, que apresentaram maiores taxas de extração foram as seguintes: extração por 45 minutos a 50°C, pH 9,0 da matriz biológica, tempo de dessorção em 45 minutos a 50°C em acetonitrila/metanol (60:40, v/v).

4.2.5 Validação analítica

A validação analítica do método padronizado tem sido realizada para assegurar a confiabilidade dos resultados apresentados. No Brasil, as agências normativas que estabelecem critérios para a validação analítica tem sido a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) e o Ministério da Agricultura [133]Neste estudo foram adotadas as normas de validação analítica estabelecidas pela ANVISA.

4.2.5.1 Seletividade do método SBSE/NACE

De acordo com a ANVISA, na resolução RE n° 899, a seletividade de um método é a capacidade de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, como impurezas, produtos de degradação e compostos endógenos da matriz biológica [122].

A seletividade do método SBSE/NACE está demonstrada através dos eletroferogramas do plasma branco de referencia enriquecido com antidepressivo e plasma branco de referencia apresentados as Figuras 30 e 31 ,respectivamente.

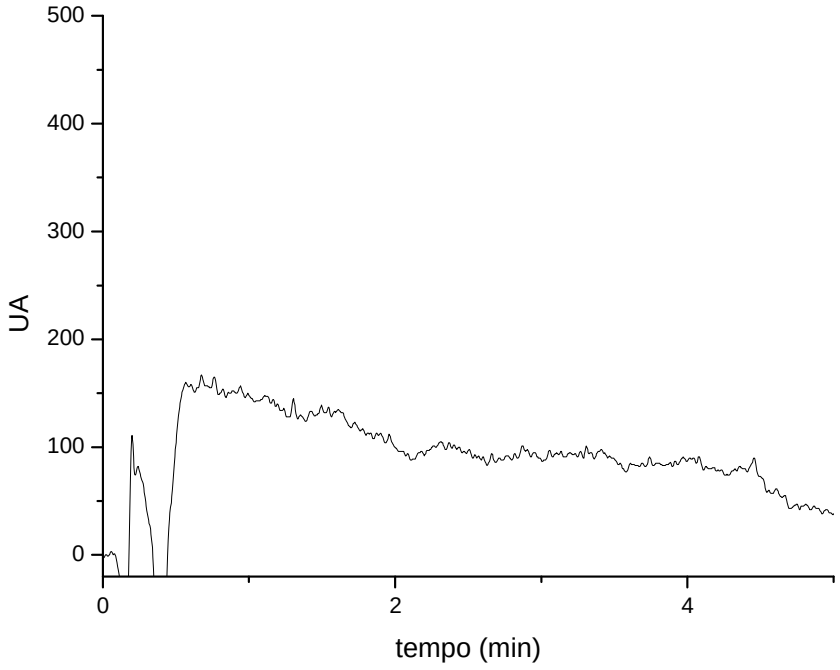


Figura 30. Eletroferograma referente à análise SBSE/NACE da amostra de plasma branco de referência. Condições SBSE: 4 mL de solução tampão borato pH 9,0, a 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em acetonitrila/metanol (60:40, v/v) durante 45 minutos. Condições eletroforéticas: eletrólito de separação 1,25 M de ácido fosfórico em acetonitrila; campo elétrico de 500 V cm^{-1}; injeção hidrodinâmica por 10 s.

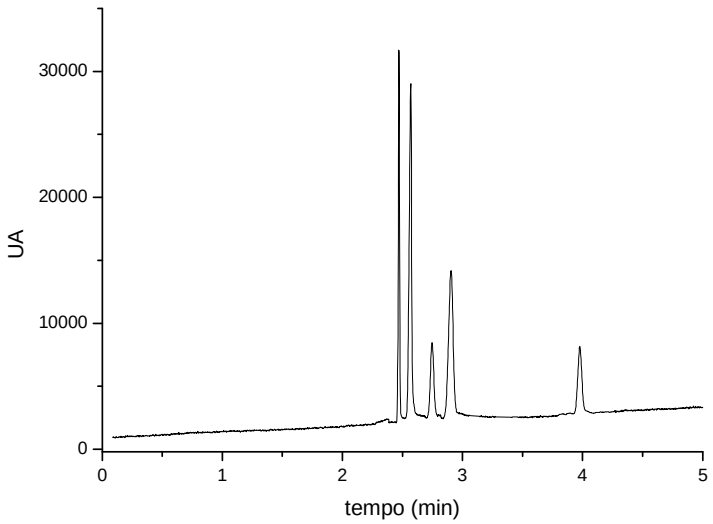


Figura 31. Eletroferograma referente à análise SBSE/NACE da amostra de plasma branco de referência enriquecido com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL^{-1}. Condições SBSE: 4 mL de solução tampão borato pH 9,0, a 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em acetonitrila/metanol (60:40, v/v) durante 45 minutos. Condições eletroforéticas: eletrólito de separação 1,25 M de ácido fosfórico em acetonitrila; campo elétrico de 500 V cm^{-1}; injeção hidrodinâmica por 10 s a 6,9 mbar. A ordem de migração dos antidepressivos é 1) sertralina, 2) paroxetina, 3) fluoxetina, 4) citalopram e 5) mirtazapina.

A identificação dos fármacos em amostras de plasma foi realizada pela comparação dos tempos de migração obtidos nas análises, com os das soluções padrão dos solutos, injetadas individualmente nas mesmas condições eletroforéticas.

4.2.5.2 Linearidade

Para avaliar se o método proposto responde proporcionalmente às concentrações do soluto, curvas analíticas foram traçadas. Assim, a linearidade do método padronizado (SBSE/NACE) foi determinada utilizando-se amostras de plasma (branco de referência) enriquecidos com os fármacos nas concentrações de 50, 100, 200 e 500 ng mL^{-1}. Os intervalos avaliados apresentaram-se lineares com coeficientes de correlação maiores que 0,99 (Tabela 9) e os coeficientes de variação dos pontos das curvas analíticas foram menores que 15%, conforme preconiza a ANVISA.

Tabela 9. Linearidade e limite de quantificação do método SBSE/NACE.

Antidepressivos	Linearidade (LOQ-500 ng mL^{1})			LOQ
	Inclinação	Intersecção	r	(ng mL^{1})
Sertralina	0,181	7,100	0,998	10
Fluoxetina	0,177	8,073	0,997	20
Citlopram	0,133	3,731	0,998	25
Paroxetina	0,113	4,731	0,997	20

4.2.5.3 Limite de Quantificação (LOQ)

O limite de quantificação foi determinado por meio do sinal eletroforético dez vezes superior a qualquer interferência (ruído) no tempo de retenção dos antidepressivos, além de apresentar coeficientes de variação menores que 20% e exatidão superior a 80%.

De acordo com a ANVISA, valores de coeficientes de variação inferiores ou iguais a 20% para o limite de quantificação são aceitáveis. Para os antidepressivos avaliados nesse estudo, o limite de quantificação variou de 10-20 ng mL^{-1} com coeficientes de variação inferiores a 15%.

4.2.5.4 Recuperação relativa, exatidão e precisão inter ensaio

A capacidade do método em extrair o soluto de interesse é representada pelo valor da recuperação. As variações entre os resultados de diferentes análises representam o coeficiente de variação geralmente expresso em %.

Para o cálculo da recuperação relativa foram consideradas as razões entre as áreas dos fármacos e do padrão interno, assim, possíveis erros podem ser minimizados ou extintos. A recuperação relativa foi calculada pela comparação direta das razoes das áreas ($A_{padrão}/A_{p.i.}$) dos fármacos obtidos nos ensaios por injeção direta de soluções padrão no sistema NACE-UV, com as razões obtidas após os ensaios SBSE/NACE de amostras enriquecidas com os analitos.

Segundo a ANVISA, são desejáveis valores de recuperação relativa próximos a 100%, mas outros valores são aceitáveis desce que a recuperação seja precisa e exata.

Na Tabela 10 estão apresentados os valores de recuperação relativa e precisão inter ensaio e exatidão dos antidepressivos para as análises de amostras de plasma enriquecido em três níveis de concentração, baixo, médio e alta, sendo que para cada concentração os testes foram realizados em replicatas.

Tabela 10. Precisão inter ensaios, exatidão e recuperação relativa do método SBSE/NACE.

Antidepressivos	**Concentração adicionada (ng mL^{1})**	**Precisão inter ensaio RSD (%)**	**Exatidão (%)**	**Recuperação (%)**
	50,0	10,5	95	92
Sertralina	200,0	4,8	101	95
	500,0	3,2	99	99
	50,0	12,6	98	85
Fluoxetina	200,0	7,8	98	88
	500,0	2,9	97	95
	50,0	11,6	96	93
Citalopram	200,0	4,5	98	87
	500,0	4,3	97	97
	50,0	9,8	97	70
Paroxetina	200,0	7,6	96	87
	500,0	2,9	101	89

(n=5)

Para minimizar a influencia das proteínas no processo de extração SBSE, as amostras de plasma enriquecidas com os antidepressivos foram diluídas com solução tampão borato, 0,05 mol L^{-1}, pH 9,0. Assim sendo, taxas de recuperação analítica próximas a 100% foram obtidas. O processo de diluição das amostras de plasma com solução tampão diminui a viscosidade da matriz favorecendo a difusão dos fármacos para a fase extratora e também contribuiu para a diminuição no tempo necessário para atingir o equilíbrio de partição. A fase PDMS extrai solutos não-iônicos. A diluição das amostras de

plasma com solução tampão permitiu o ajuste do pH da matriz favorecendo a supressão da ionização dos fármacos (valores de pKa de 8,7 a 10,2), aumentado, dessa forma, a afinidade destes com a fase extratora de PDMS.

O método padronizado apresentou valores de exatidão na faixa de 95 a 101% (Tabela 10). De acordo com as normas da ANVISA, valores de exatidão entre 80 e 120% são desejáveis [122]. O método padronizado apresentou valores de precisão inter ensaios com RSD inferiores a 15%. (Tabela 9)

4.2.5.5 Aplicabilidade do método SBSE/NACE

De acordo com os parâmetros de validação, o método SBSE/NACE é adequado para análises de antidepressivos em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica, apresentado repetitividade, limite de quantificação, linearidade e especificidade de acordo com os valores preconizados pela ANVISA.

Para avaliar a aplicabilidade do método SBSE/NACE padronizado ao uso clínico, amostras de plasma de pacientes em terapia com os antidepressivos foram analisadas, utilizando as condições otimizadas.

Os eletroferogramas SBSE/NACE referentes às análises dessas amostras são apresentados na Figura 32.

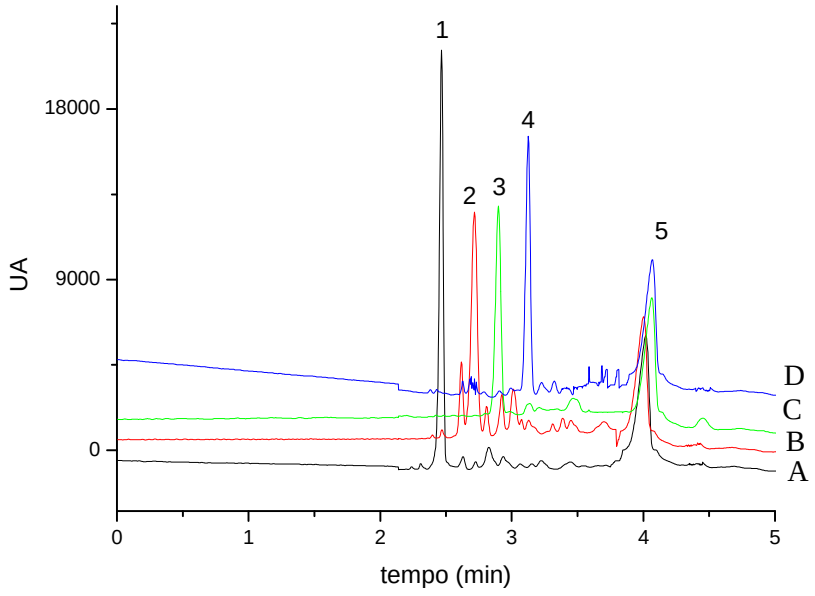


Figura 32. Eletroferogramas referente à análise SBSE/NACE da amostra de plasma de paciente em terapia com os antidepressivos. Concentraçcões determinadas: A) (1) sertralina (223,5 ng mL^{-1}); B) (2) fluoxetina (32,0 ng mL^{-1}); C) (3) citalopram (241,3 ng mL^{-1}); D) (4) paroxetina (287,4 ng mL^{-1}) e (5) padrão interno. Condições de análise: injeção 10 s a 6,9 mbar; campo elétrico 500 V cm^{-1}, eletrólito de separação: ácido fosfórico 1,25 mol L^{-1} em acetonitrila.

As concentrações encontradas nessas amostras de plasma de pacientes foram as seguintes: 223,5 ng/mL para a sertralina, 32,0 ng/mL para fluoxetina ,241,3 para o citalopram, 287,4 ng/mL para paroxetina. Essas amostras forma coletadas de pacientes em terapia com antidepressivos.

4.3. Determinação de antidepressivos ISRSs em amostras de plasma por micro extração em sorvente empacotado e eletroforese capilar em meio não aquoso (MEPS/NACE)

4.3.1 Padronização do método MEPS/NACE-UV para análise simultânea de antidepressivos

4.3.1.1 Otimização das variáveis da MEPS

As variáveis MEPS, pH da amostra e volume dos ciclos aspirar-dispensar foram otimizadas para estabelecer o equilíbrio de sorção em menor tempo de análise e obter sensibilidade analítica adequada para a determinação dos antidepressivos no intervalo terapêutico.

Dentre as soluções tampão avaliadas nos diferentes valores de pH, a diluição das amostras de plasma com solução tampão fosfato 50 mmol L^{-1} em pH 4,0 a 5,5 favoreceu a sensibilidade analítica do método MEPS/NACE. Em meio ácido os antidepressivos encontram-se ionizados favorecendo, assim, a extração pela fase mista composta por C8 e trocador de cátions (Figura 33).

O volume de amostra diluída aspirar-dispensar (50, 100 e 250 μL) foi avaliado para assegurar adequada eficiência do processo de extração. As melhores taxas de extração foram obtidas com o volume de 250 μL de amostra diluída (Figura 34).

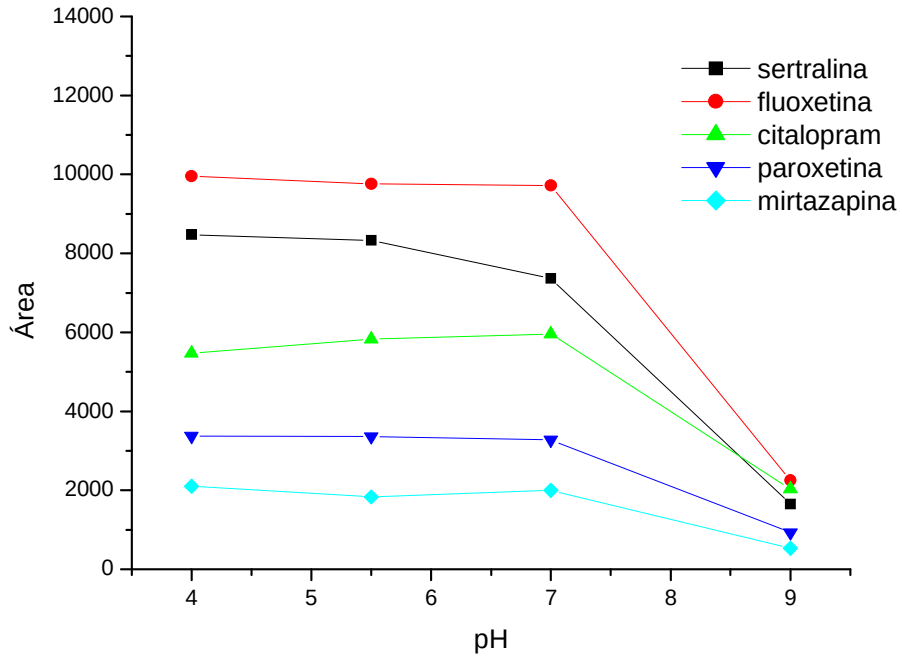


Figura 33. Efeito do pH das amostras de plasma diluídas com solução tampão fosfato e borato. Ensaios realizados com 400 µL amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos (500 ng mL^{-1}) diluída com 400 µL de solução tampão e dessorção líquida dos analitos com 150 µL tampão fosfato 50 mmol L^{-1} pH 4,5 e metanol (v/v 55:45).

O número de ciclos (1, 3 e 5) aspirar/dispensar foi também avaliado, Figura 35.

Para assegurar total eliminação de analitos e compostos endógenos retidos no sorvente MEPS, este foi lavado com 250 µL de solução de ácido fórmico (0,1%) e 250 µL de metanol entre as extrações MEPS [134].

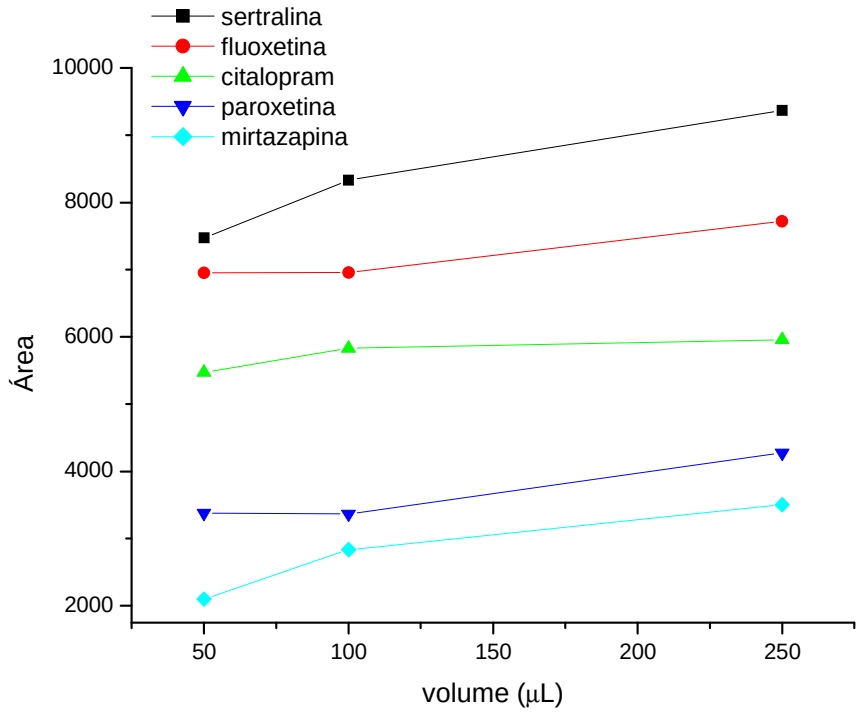


Figura 34. Efeito do volume da amostra diluída aspirar/dispensar na eficiência do processo MEPS.

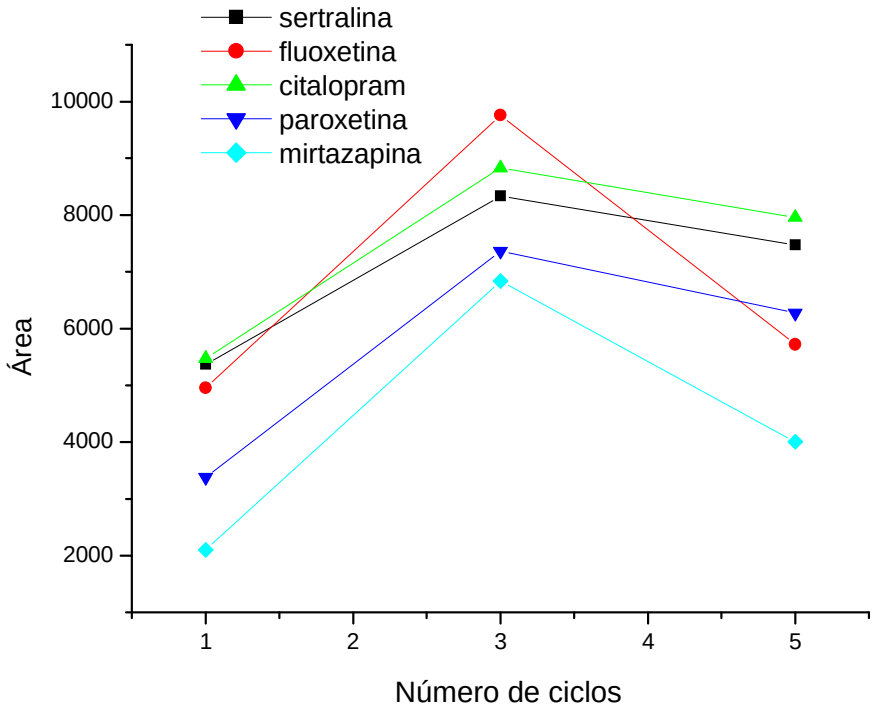


Figura 35. Efeito dos ciclos aspirar/dispensar na influência do processo MEPS. Ensaios realizados com 250 µL de amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos (500 ng mL^{-1})

De acordo com os resultados obtidos, as melhores condições MEPS para análise de antidepressivos em amostras de plasma foram as seguintes: 400 µL de plasma diluídos com 400 µL de solução tampão fosfato 50 mmol L^{-1} (pH 4,0), extração realizada com 3 ciclos aspirar/dispensar (3 x 250µL), lavagem do sorvente com 250 µL de solução aquoso de ácido fórmico (0,1%) e dessorção com 150 µL tampão fosfato 50 mmol L^{-1} pH 4,5 e metanol (v/v 55:45).

Quanto ao tempo de extração usando MEPS, este foi de aproximadamente 3 min. O tempo de análise eletroforética foi inferior a 5

minutos e, portanto, o tempo total aproximado decorrido para extração e detecção dos fármacos foi de apenas 8 minutos.

4.3.2 Validação do método MEPS/NACE

A seletividade do método MEPS/NACE desenvolvido foi demonstrada pelos eletroferogramas obtidos de amostra de plasma brando (referência) e amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos (Figura 36).

Os eletroferogramas obtidos mostram a capacidade do método em quantificar os antidepressivos na presença de compostos endógenos do plasma. Diferentes amostras de plasma branco de referência foram avaliadas e não foram detectados interferentes nos tempos de migração dos antidepressivos.

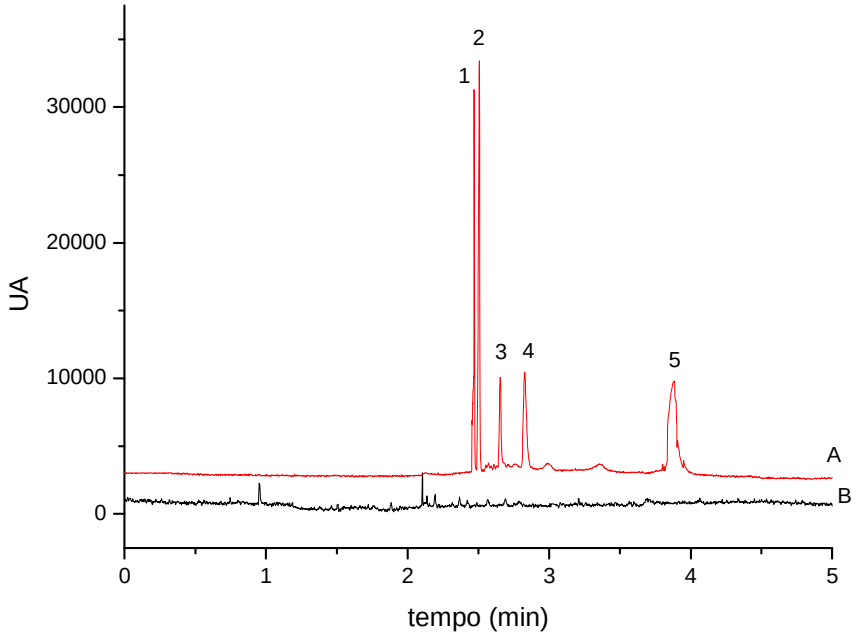


Figura 36. Eletroferogramas MEPS/CE. A) amostra de plasma branco de referência enriquecida com os fármacos na concentração de 500 ng mL^{-1}. (1) Sertralina, (2) fluoxetina, (3) citalopram, (4) paroxetina e (5) mirtazapina, como padrão interno. B) amostra de plasma de referência. Condições de análise:; campo elétrico 500 V cm^{-1}, eletrólito de separação: ácido fosfórico 1,25 mol L^{-1} em acetonitrila.

O limite de quantificação foi determinado por meio do sinal eletroforético dez vezes superior a qualquer interferência (ruído) no tempo de migração dos antidepressivos, além de apresentar coeficientes de variação menores que 20% e exatidão superior a 80% (Tabela 11).

A linearidade do método MEPS/NACE foi determinada com amostras de plasma branco de referência enriquecidas com solução padrão dos antidepressivos na concentração do LOQ até 500 ng mL^{-1}. As equações das

regressões lineares, os coeficientes de correlação correspondentes (r) e os valores de LOQ são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Linearidade e limite de quantificação (LOQ) do método MEPS/NACE para análise de antidepressivos em amostras de plasma.

Antidepressivos	Linearidade LOQ – 500 ng mL^{-1}			LOQ ($ng\ mL^{-1}$)
	Inclinação	Intersecção	r	
Sertraline	0,0068	0,0202	0,998	20
Fluoxetine	0,004	0,0606	0,998	25
Citalopram	0,002	0,0486	0,999	30
Paroxetine	0,008	0,0311	0,997	25

A precisão inter ensaio, recuperação relativa e a exatidão do método MEPS/NACE foram determinados através da análise em replicatas (n=5) de amostras de plasma humano branco de referência enriquecidas com solução padrão dos antidepressivos em três diferentes níveis de concentração (Tabela 12).

Tabela 12. Precisão inter ensaios, exatidão e recuperação absoluta do método MEPS/NACE.

Antidepressivos	Concentração adicionada (ng mL^{1})	Precisão inter ensaio RDS (%)	Exatidão (%)	Recuperação (%)
Sertralina	50	8,5	97	90
	200	3,8	93	96
	500	3,2	95	98
Fluoxetina	50	7,6	95	87
	200	5,8	92	92
	500	3,9	94	96
Citalopram	50	8,7	97	94
	200	4,4	98	89
	500	4,0	99	96
Paroxetina	50	6,8	95	90
	200	4,6	97	87
	500	2,9	101	93

(n=5)

Os valores dos coeficientes de variação variaram de 2,9 a 8,7% e estão em acordo com os obtidos para a técnica MEPS no modo manual [135], [136]. O método desenvolvido apresentou exatidão, precisão e LOQ adequados para análise de antidepressivos em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica.

4.3.3 Aplicação do método MEPS/NACE desenvolvido

O método desenvolvido foi utilizado para análises de amostras de plasma de pacientes em terapia com os antidepressivos estudados neste trabalho e os eletroferogramas obtidos estão apresentados na Figura 37.

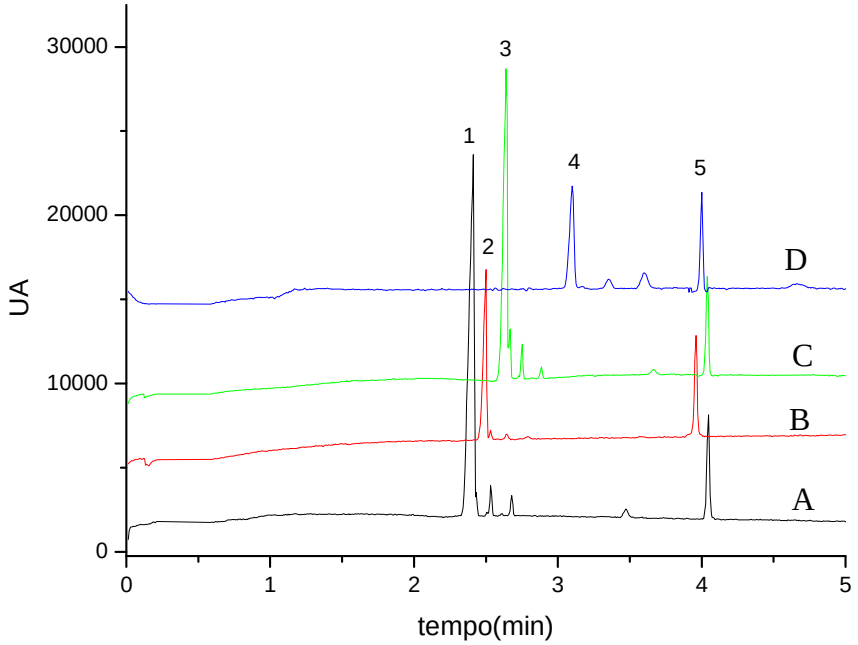


Figura 37. Eletroferogramas MEPS/CE de amostras de plasma de pacientes em terapia com os antidepressivos. Concentrações determinadas A) (1) Sertralina (387,1 ng mL^{-1}); B) (2) fluoxetina (220,1 ng mL^{-1}); C) (3) citalopram (233,8 ng mL^{-1}); D) (4) paroxetina (403,5 ng mL^{-1}) e (5) mirtazapina (100 µg mL^{-1}). Condições de análise: injeção 10 s a 6,9 mbar; campo elétrico 500 V cm-1, eletrólito de separação: ácido fosfórico 1,25 mol L-1 em acetonitrila.

4.4 Comparação entre as metodologias padronizadas

O método MEPS/NACE quando comparado aos métodos LLE/NACE e SBSE/NACE desenvolvidos, apresentou as seguintes vantagens: menor tempo de extração e precisão interensaios com menores coeficientes de variação.

Os valores de LOQ para todos os métodos ficaram entre 10 a 30 ng mL^{-1} e os valores de exatidão foram maiores para o método LLE/NACE (Tabela 13). Entretanto, todas as metodologias padronizadas apresentam valores de exatidão superiores a 87%.

As metodologias desenvolvidas com as técnicas de microextração resultaram em procedimentos de extração com reduzido número de etapas, menores volumes de amostras biológicas e de solventes orgânicos, somente alguns μL no processo de dessorção. Consequentemente, a exposição dos analistas a solventes tóxicos e aos fluidos biológicos foi também minimizada.

As microextração (SBSE e MEPS) foram realizadas em condições experimentais que representam o equilíbrio da sorção. As extrações realizadas em condições que representam o equilíbrio de sorção apresentaram precisão analítica com menores coeficientes de variação.

Tabela 13. LOQ, exatidão, precisão interensaio (RSD %) e tempo de extração para as metodologias LLE/NACE, SBSE/NACE e MEPS/NACE para análises de antidepressivos (200 ng mL^{-1}) em amostras de plasma.

Fármacos	**LOQ (ng mL^{-1})**			**Exatidão intra ensaio (%) (200 ng mL^{-1})**			**Precisão RSD (%) (200 ng mL^{-1})**			**Tempo de extração (min)**		
	LLE	**SBSE**	**MEPS**	**LLE**	**SBSE**	**MEPS**	**LLE**	**SBSE**	**MEPS**	**LLE**	**SBSE**	**MEPS**
Sertralina	20	10	20	97	95	93	4,7	4,8	3,8	45	45	3
Fluoxetina	15	20	25	96	88	92	5,9	7,8	5,8	45	45	3
Citalopram	30	25	30	97	87	98	6,2	4,5	4,4	45	45	3
Paroxetina	20	30	25	98	87	97	5,2	7,6	4,6	45	45	3

5. Conclusão

Em razão da complexidade das amostras de plasma utilizadas neste estudo, e da presença dos fármacos nestes fluidos biológicos em níveis de traços, a etapa de preparo de amostra, no desenvolvimento das metodologias, foi de extrema importância para a eliminação de compostos endógenos (etapa de limpeza) e aumento da seletividade (extração seletiva) e da sensibilidade analítica (concentração dos fármacos).

A otimização das variáveis das técnicas SBSE e MEPS aumentou a eficiência das extrações, reduziu os tempos das análises e permitiu estabelecer condições experimentais que apresentam o equilíbrio da sorção. As extrações realizadas em condições que representam o equilíbrio de sorção apresentaram precisão analítica com menores coeficientes de variação.

As técnicas de microextração SBSE e MEPS permitiram a miniaturização do sistema analítico, a reutilização das fazes extratoras, a diminuição do consumo de solventes orgânicos, do volume de amostras biológicas e do número de etapas do processo de extração. Consequentemente, a exposição dos analistas a solventes tóxicos e aos fluidos biológicos foi também minimizada. Além destas vantagens, a técnica MEPS permitiu análises rápidas, com extrações realizadas em aproximadamente 3 minutos. A associação das técnicas MEPS/NACE-UV resultaram em análises rápidas (aproximadamente 7 min) de antidepressivos em amostras de plasma.

Segundo os parâmetros de validação analítica os métodos de microextração padronizados (SBSE/NACE E MEPS/NACE) possibilitaram as análises dos antidepressivos em concentrações que contemplam o intervalo

terapêutico. A eficácia e aplicabilidade dos métodos, padronizados e validados, foram comprovadas através das análises de amostras de plasma de pacientes em terapia com os antidepressivos avaliados.

De acordo com os parâmetros de validação analítica avaliados, os métodos padronizados (LLE/NACE, SBSE/NACE e MEPS/NACE) podem ser aplicados nas análises de antidepressivos (fluoxetina, paroxetina, sertralina e citalopram) em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica.

As metodologias padronizadas também poderão ser empregadas na avaliação de níveis plasmáticos, em análises toxicológicas de urgência; após administração acidental de elevadas dose ou em casos de suicídios.

6. Referências

1. ROMEIRO, L. A. S.; FRAGA. C. A. M.; BARREIRO, E. J. Novas estratégias terapêuticas para o tratamento da depressão: uma visão da química medicinal. Química. Nova, v. 26, n. 3, p. 347-358, 2003.

2. FLECK, M. P. A.; SOURGEY, E. B., DEL PORTO, J. A., BRASIL, M. A., JURUENA, M. F. Diretrizes da associação medica brasileira para tratamento da depressão. Revista Brasileira de Psiquiatria, v. 25, n.2, p. 114-122, 2003.

3. DOCHERTY, J. P.; Barriers to the diagnosis of depression in primary care. Journal of Clinical Psychiatry, v. 58, p. 5-10. 1997

4. KOZIEK, M., MIDDLEMAS, D., BYLUND, D. B. Brain-derived neurotrophyc factor and its receptor tropomyosin-related kinase B in the mechanism of action of antidepressant therapies. Pharmacology & Therapeutics, v 117, p. 30 – 51, 2008.

5. SILVA, P. Farmacologia. 5 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S. A.; 1998, 1314 p.

6. DALLET, P.; LABAT, L.; RICHARD, M.; LANGLOIS, M. H.; DUBOST, J. P. Journal of Liquid Chromatography. & Related. Technologies, 25 (1), 101-111, 2002.

7. MANDELLI, L.; SERRETTI, A.; ZANARDI, R.; ROSSINI, D.; DE RONCHI, D.; TARRICONE, I.; COLOMBRO, C.; Antidepressants response in the elderly. Psychiatric Research, v. 152, p. 37-42, 2008.

8. NASH, J.; NUTT, D.; Antidepressants: Specific treatment and disorders. Psychiatric, v 6, n 7, 289-294, 2007.

9. BATEMAN, D. N.; Antidepressants: poisonous substances. Medicine, v 35, n11, p. 587-589, 2007.

10. MUNOZ-ARROYO, R.; SUTTON, M.; MORRISON, J.; Exploring potencial explanations for the increase in antidepressants prescribing in Scotland using secondary analyses of routine data. The British Journal of General Practice, v 56, p. 423-428, 2006.

11. ANDERSON, I. M. Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a meta-analysis of efficacy and tolerability. Journal of Affective Disorders, v. 58, p. 19-36, 2000.

12. MAREK, G. J.; CARPENTER, L. L.; MCDOUGLE, C. J.; PRICE, L. H. Synergistic action of 5-HT2A antagonists and selective serotonin reuptake inhibitors in neuropsychiatric disorders. Neuropsychopharmacology. vol 28, p. 402-412, 2003.

13. NUTT, D. J. Death by tricyclic: the real antidepressant standard Journal of Psychopharmacology, v. 19, p. 123-124, 2005.

14. BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. Goodman and Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica, 11o Ed., p. 383 – 403, 2005.

15. TITIER, K.; CASTAING, N.; SCOOTTO-GOMEZ, E.; PEHOURCQ, F.; MOLIMARD, M.; High performance liquid chromatographic method with diode array detection for identification and quantification of the eight new antidepressants and five of their active metabolites in plasma after overdose. Therapeutic Drug Monitoring, v. 25, p. 581-587, 2003.

16. SZASZ, B. K.; MIKE, A.; KAROLY, R.; GEREVICH, Z.; ILLES, P.; VIZI, S. E.; KISS, J. P.;i, S. E., Kiss, J. P. Direct inhibitory effect of fluoxetine on N-methyl-d-aspartate receptors in the central nervous system.Biological Psychiatry, v 62, p. 1303 – 1309, 2007.

17. PENG, Q.; MASSUDA, N.; JIANG, M.; LI, Q.; ZHAO, M.; ROSS, C. A.; DUAN, Z. The antidepressant sertraline improves the phenotype, promotes neurogenesis and increase BDNF levels in the R6/2 Huntington's disease mouse model. Experimental Neurology,v. 210, p. 154-163, 2008.

18. SHIN, J. G.; KIM, K. A.; YOON, Y. R.; CHA, I. J.; KIM, Y. H.; SHIN, S. G.; Rapid simple high-performance liquid chromatographic determination of

paroxetine in human plasma. Journal of chromatography B, v. 713, p. 452-456, 1998.

19. CALULL, C.; DOMINGUEZ, N.; Determination of paroxetine in plasma by high-performance liquid chromatography for bioequivalence studies. Journal of chromatography B, v. 724, p. 393-398, 1999.

20. ROMIGUIERES, T.; PEHOURCQ, F.; MATOGA, M.; BEGAUD, B, JARRY, C.; Determination of mirtazapine and its demethyl metabolite in plasma by high-performance liquid chromatography with ultravioleta detection. Journal of chromatography B, v 775, p. 163-168, 2002.

21. PTÁCEK, P.; KLIMA, J.; MACEK, J.; Determination of mirtazapine in human plasma by liquid chromatography. Journal of chromatography B, v. 794, p. 323-328, 2003.

22 DUVERNEUIL, C.; GRANDMAISON, L,; MAZANCOURT, R.; ALBAREZ, J. C.; A high-performance liquid chromatography method with photodiode-array UV detection for therapeutic drug monitoring of the nontricyclic antidepressants drugs. Therapeutic Drug Monitoring, v. 25, p. 565-573, 2003.

23. BURKE, M.J.; PRESKORN, S. H.; Therapeutic drug monitoring of antidepressants – Cost implications and relevance to clinical practice. Clinical Pharmacokinetics, v. 37, p. 147-165, 1999.

24. TAYLOR, W. J.;ROBINSON, J. D.; SPIVEY-MILLER, S. Handbook of therapeutic monitoring. 2 ed. Cincinatti: Harvey Whitney Books Company, 1993. P. 1-10.

25. Worden, J. P. , Therapeutic drug monitoring. Current Surgery, v. 51, n.7, 4299-4435, 1994.

26.GOODNICK, P. J.; GOLDSTEIN, B. J.;Selective serotonin reuptake inhibitors in affective disorders: Basic pharmacology. J Psychopharmacol. Vol 12, n3 suppl B, 3-20, 1998.

27. TITIER, K.; CASTAING, N.; SCOTTO-GOMEZ, E.; PEHOURCQ, F.; MOLIMARD, M. High-Performance Liquid Chromatographic Method with Diode Array Detection for Identification and Quantification of the Eight new antidepressants and five of their active metabolites in plasma after overdose. Ther. Drug Monit. Vol 25, 581-587, 2003.

28. SILVA, B. J. G.; QUEIROZ, R. H. C.; QUEIROZ, M. E. C.; Simultaneous determination of nontricyclic antidepressants in human plasma by solid-phase microextraction and liquid chromatography (SPME/LC). Journal of Analytical Toxicology, v. 31, p. 313-320, 2007.

29. MALFARÁ, W. R.; BERTUCCI, C.; QUEIROZ, M. E. C.; CARVALHO, S. A. D.; BIANCHI, M. L. P.; CESARINO, E. J.; CRIPPA, J. A.; QUEIROZ, R. H. C.

Reliable HPLC method for therapeutic drug monitoring of frequently prescribed tricyclic and nontricyclic antidepressants. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 44, p. 955-962, 2007.

30. MUSA, M. N. Pharmacokinetics and therapeutic monitoring of psychiatric drugs. Springfield: Charles C. Thomas, p. 41-56, 1993.

31. QUEIROZ, M. E. C.; LANÇAS, F. M.; Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextraçao em fase sólida “no tubo”e cromatografia líquida de alta eficiência. Química Nova, vol. 28, n. 5, 880-886, 2005.

32. THEURILLAT, R.; THORMANN, W.; Monitoring of tricyclic antidepressants in human serum and plasma by HPLC: characterization of a simple, laboratory developed method via external quality assessment. Journal of Pharmaceutica and Biomedical Analysis, v. 18, n. 4-5, p. 751-760, 1998.

33. KIM, K. M.; JUNG, B. H.; CHOI, M. H.; WOO, J. S.; PAENG, K. J.; CHUNG, B. C.; Rapid and sensitive determination of sertraline in human plasma using gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography B, v 769, p. 33-339, 2002.

34. FRAHNERT, C.; RAO, M. L.; GRASMADE, K. Analysys of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by

liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring. Journal of Chromatography B, v. 794, p. 35-47, 2003.

35. MANDRIOLI, R.; SARACINO, M. A.; FERRARI, S.; BERALDI, D.; KENNDELER, E.; RAGGI, M. A.; HPLC analysis of the second-generation antidepressant sertraline and its main metabolite Npdesmethylsertraline in human plasma. Journal of Chromatography B, v. 836, p. 116-119, 2006.

36. JUAN, H.; ZHILING, Z.; HUANDE, L. Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/ESI). Journal of Chromatography B, v. 820, p. 33-39, 2005.

37. LI, K. M.; THOMPSON, M. R.; MCGREGOR, I. S.; Rapid quantitation of fluoxetine and norfluoxetine in serum by micro-disc solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography–ultraviolet absorbance detection. Journal of Chromatography B., vol. 804, 319-326, 2004.

38. ERNY, G. L.; CIFUENTES, A.; Liquid separation techniques coupled with mass spectrometry for chiral analysis of pharmaceuticals compounds and their metabolites in biological fluids. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 40, n. 3, 509-515, 2006.

39. KIM, I.; DARWIN, W. D.; HUETIS, M. A.; Simultaneous determination of nicotine, cotinine, norcotinine, and trans-3′-hydroxycotinine in human oral fluid using solid phase extraction and gas chromatography–mass spectrometryJ. Chromatogr. B. 2005, vol. 814, n. 2, 233-240.

40. CIOLA, R.Fundamentos da Cromatografia a líquido de Alto Peso Desempenho. São Paulo, Edgard Blücher, 1998, 179p.

41. SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. Analytical Chemistry: an introduction. Philadelphia, Saunders College, 1990. 642p.

42. DAY, R. A.; Underwood, A. L. Quantitative Analysis. New Jersey, Prentice-Hall, 1991. 685p.

43. WALLES, M.; MULLETT, W. M.; PAWLISZYN, J. Monitoring of drugs and metabolites in whole blood by restricted-access solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-mass scpectrometry. Journal of Chromatography A, v. 1025, n. 1. p. 85-92, 2004.

44. ERNY, G. L.; CIFUENTES, A. Liquid separation techniques coupled with mass spectrometry for chiral análisis of pharmaceuticals compounds and their metabolites in biological fluids. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 40, n. 3, p. 509-515, 2006.

45. ZAMBONIN, C. G.; ARESTA, A.; PALMISANO, F. Determination of the immunosuppressant mycophenolic acid in human serum by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography. Journal of Chromatography B, v. 806, n. 2, p. 89-93, 2004.

46. ARESTA. A.; PALMISANO, F.; ZAMBONIN, C. G. Determination of naproxen in human urine by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 39, n. 3-4, p. 643-647, 2005.

47. LORD, H., PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. Journal of Chromatography A, v. 902, p. 17-63, 2000.

48. BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.;FRANK, D.; CRAMERS, C., Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Thery and principles. J. Microcol. Sep. 11 (1999) 737-747.

49. KAWAGUCHI, M.; ITO, R.; SAITO, K.; NAKAZAWA, H. Novel stir bar extraction methods for environmental and biomedical analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 40. p. 500-508, 2006.

50. DAVID, F.; SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction for trace analysis. Journal of Chromatography A.; v. 1152, n. 1-2, p. 54-69, 2007.

51. BALTUSSEN, E.; CRAMERS, C. A.; SANDRA, P. J. F. Sorptive sample preparation – a review. Analytical and Bionalytical Chemistry, v. 373, p. 3 – 22, 2002.

52. PAWLISZYN, J. Applications of solid phase microextraction; Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999. p. 45.

53. PAWLIZAYN, J. Theory of solid-phase microextraction. Journal of chromatography Science, v. 38, n. 7, p. 270-278, 2000.

54. BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; JANSSEN, H. G.; CRAMERS, C. A. Study into the equilibrium mechanism between water and poly(dimethylsiloxane) for very apolar solutes: adsorption or sorption? Analytical Chemistry, v. 71, p. 5213-5216, 1999.

55. LIU, W.; WANG, H.; GUAN, Y. Preparation of stir bars for extraction using sol-gel techniques. Journal of chromatography A, v. 1045, p. 15-22, 2004.

56. XIAOLAN, Z.; CAI, J.; JUAN, Y.; SU, Q.; YUN, G. Films coated with imprited polymers for the selective stir bar sorption extraction of monocrotophos. Journal of Chromatography A., v. 1131, p. 37-44, 2006.

57. MELO, L. P.; NOGUEIRA, A. M.; LANÇAS, F. M.; QUEIROZ, M. E. C. Polydimethylsixane/polyryrrole stir bar sorptive extraction and liquid

chromatography (SBSE/LC-UV) analysis of antidepressants in plasma samples. Journal of Chromatography B,

58. BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; CRAMERS, C. A. Stir bar sortive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. Journal of Microcolumn Separations, v. 11, p. 737-747, 1999.

59. LAMBERT, J. P.; MOLLET, W. M.; KWONG, E.; LUBDA, D. Stir bar sorptive extraction based on restricted access material for the direct extraction of caffeine and metabolites in biological fluids. Journal of Chromatography A, v. 1075, p. 43-49, 2005.

60. BICCHI, C.; CORDERO, C.; RUBIOLO, P.; SANDRA, P. Impacto f water /PDMS phase ratio, volume of PDMS, and sampling time on Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) recovery of some pestidides with different $K_{o/w}$. Journal of Separation Science, v. 26, p. 1650-1656, 2003.

61. DAVID, F.; SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction for trace analysis. Journal of Chromatography A, v. 1152, n. 1-2, p. 54-69, 2007.

62. M. Kawaguchi, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa. Novel stir bar sorptive extraction methods for environmental and biomedical analysisJournal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 40 (2006) 500–508.

63. E. Baltussen, F. David, P. Sandra, H. G. Janssen, C. A. Cramers. Sorption tubes packed with polydimethylsiloxane: a promising technique for the preconcentration of volatiles and semi-volatiles from air and gaseous samples . J. High Resol. Chromatogr 21 (1998) 332-340.

64. TIEPONT, B.; DAVID, F.; BENJITS, T.; SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction – thermal desorption – capillary CG-MS for profiling and target compounds analysis of pharmaceutical drugs in urine. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 32, p. 569-579, 2003.

66. COENSELÇ N.; DESMET, K.; GORECKI, T.; SANDREA, P. Determination of polydimethylsiloxane partition coefficients using headspace sorptive extraction. Journal of Chromatography A, v. 1150, p. 183-189, 2007.

67. DAVID, F.; TIEPONT, B.; SANDRA, P. Stir-bar sorptive extraction of trace organic compounds from aqueous matrices. LCGC North America, v. 27, p. 108-114, 2003.

68. KAWAGUCHI, M.; ISHII, Y.; OKANOUCHI, N.; ITO, R.; INOUE, K.; SAITO, K.; NAKAZAWA, H. Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry in the multi-shot

mode for determination of estrogens in river water samples. Journal of Chromatography A, v. 1049, p. 1-8, 2004.

69. OCHIAI, N.; SASAMOTO, K.; DAISHIMA, S.; HEIDEN, A. C.; HOFFMANN, A. Determination of stale-flavor carbonyl compounds in beer by stir bar sorptive extraction with in-situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A, v. 986, p. 101-110, 2003.

70. BENANOU, D.; ACOBAS, F.; DE ROUBIN, M. R.; DAVID, R.; SANDRA, P. Analysis of off-flavors in the aquatic environment by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary GC/MS/ofactometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 376, p. 69-77, 2003.

71. FERNANDES, C.; JIAYU, P.; SANDRA, P. LANÇAS, F. M. Stir bar sorptive extraction LC-MS for analysis of fluoxetine in plasma. Chromatographia, v. 64, n. 9-10, p. 517-522, 2007.

72. STOPFORTH, A.; BURGER, B. V.; CROUCH, A. M.; SANDRA, P. Uranalysis of 4-hidroxynonenal, a marker of oxidative stress, using stir bar sortive extraction-thermal desorption-gas chromatography/mass spectrometry. Journal of Chromatography B, v. 834, p. 134-140, 2006.

73. STOPFORTH, A.; GROBBELAAR, J. C.; CROUCH, A. M.; SANDRA, P. Quantification of testosterone and epitestosterone in human urine samples by stir bar sorptive extraction- thermal desorption-gas chromatography/mass spectrometry: application to HIV- positive urine samples. Journal of Separation Science, v. 30, p. 257-265, 2007.

74. ROSÁRIO, P. M. A.; NOGUEIRA, J. M. F.; Combining stir bar sorptive extraction and MEKC for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in environmental and biological matrices. Electrophoresis, v. 27, p. 4694-4702, 2006.

75. KAWAGUCHI, M.; SAKUI, N.; OKANOUCHI, N.; ITO, R.; SAITO, K.; IZUMI, S.; MAKINO, T.; NAKAZAWA, H. Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption- gás chromatography – mass spectrometry for measurment of phenolic xenostrongens in human urine samples. Journal of Chromatography B, v. 820, p. 49-57, 2005.

76. KAWAGUCHI, M.; KINOUE, N.; SAKUI, R.; ITO, S.; IZUMI, T.; MAKINO, N.; OKANOUCHI, N.; KNAZAWA, H. Stir bar sorptive extraction and thermal desorption – gás chromatography – mass spectrometry for measurment of 4 – nonylphenol and 4 – tertoctylphenol in human biological samples. Journal of Chromatography B, v. 799, p. 119-125, 2004.

77. STOPFORTH 2005, ACIDO TUBERCULO

78. ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J. M. F. Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 41, p. 1303-1311, 2006.

79. HUANG, X.; YUAN, D.; HUANG, B.; Determination of steroid sex hormones in urine matrix by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and liquid chromatography with diode arraqy detection. Talanta, v. 75, p. 172-177, 2008.

80. Abdel-Rehim, M. Journal of Chromatography B, 801 (2004) 317-321.

81. ABDEL-REHIM, M. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. Journal of Chromatography A, v. 1217, p. 2569-2580, 2010.

82. ABDEL-REHIM, M. New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography B, v. 801, p. 317-321, 2004.

83. MARALES-CID, G.; CÁRDENAS, S.; SIMONET, B. M., VALCÁRCEL, M.; Fully automatic sample treatment by integration of microextraction by packed

sorbents into commercail capillary electrophoresis-mass spectrometry equipment: application to the determination of fluoroquinoloenes in urine. Analytical Chemistry, v. 81, p.3188-3193.

84. MORALES-CID, G.; CÁRDENA, S.; SIMONET, B. M.; VALCÁRCEL, M. Direct automatic determination of free and total anesthetic drugs in human plasma by use of a dual (microdialysis-microextraction by packed sorbent) sample treatment coupled at-line to NACE-MS, Electrophoresis, v. 30, p. 1684-1691, 2009.

85. ALTUN, Z.; M. ABDEL-REHIM, M.; BLOMBERG, L. G. New trends in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe (MEPS) for LC and GC applications Part III: Determination and validation of local anaesthetics in human plasma samples using a cation-exchange sorbent and MEPS-LC-MS-MS. Journal of Chromatography B, v. 813, p. 129-135, 2004.

86. ABDEL-REHIM, M.; DAHLGREN, M.; BLOMBERG, L. G. Quantification of ropivacaine and its major metabolites in human urine samples utilizaing microextraction in a packed syringe automated with liquid chromatography tandem mass spectrometry (MEPS-LC-MS/MS). Journal of Separation Science, v. 29, p. 1658-1661, 2006.

87. ABDEL-REHIM, M. New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gás chromatography

applications I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography B, v. 801, p. 317-321, 2004.

88. ABDEL-REHIM, M.; ANDERSSON, L. I.; ALTUN, Z.; BLOMBERG, L. G. Microextraction in packed syringe online with liquid chromatography-tandem mass spectrometry: molecularly imprinted polymer as packing material for MEPS in selective extraction of ropivacaine from plasma. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v. 29, p. 1725-1736, 2006.

89. ABDEL-REHIM, M.; ALTUN, Z.; BLOMBERG, L. G. Microextraction in packed syringe (MEPS) for liquid and gás chromatographyc applications. Part II – Determination of ropivacaine and its metabolites in human plasma samples using MEPS with liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Journal of Mass Spectrometry, v. 39, 1488-1493, 2004.

90. CHAVES, A. R.; LEANDRO, F. Z.; CARRIS, J. A.; QUEIROZ, M. E. C. Microextraction in packed sorbent for analyis of antidepressants in human plasma by liquid chromatography and spectrophotometric detection. Journal of Chromatography B, v. 879, p. 2123-2129, 2010.

91. EL-BEQQALI, A.; KUSSAK, A.; ABDEL-REHIM, M.Determination of dopamine and serotonin in human urine samples utilizing microextraction online

with liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. Journal of Separation Science, v. 30, p. 421-424, 2007.

92. KAMEL, M.; SAID, R.; ELBEQQALI, A.; BASSAUYOUNI, F.; ABDEL-REHIM, M. On-line determination of cyclophosphamide in blood samples utilizing microextraction by packed sorbent and liquid chromatography tandem mass spectrometry (MEPS-LC-MS/MS). The Open Spectroscopy Journal, v. 3, p. 26-30, 2009.

93. SAID, R.; HASSAN, Z.; ABDEL-REHIM, M. Rapid and sensitive method for determination of cyclophosphamide in patients plasma samples utilizing microextraction by packed sorbent online with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (MEPS-LC-MS/MS). Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v. 31, p. 683-694, 2008.

94. ABDEL-REHIM, M.; HASSAN, Z.; SKANSEM, P.L HASSAN, M. Simultaneous determination of busulphan in plasma samples by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry utilizing microextraction in packed syringe (MEPS) as on-line sample preparation method. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v. 30, p. 3029-3041, 2007.

95. VITA, M.; SKANSEM, P.; HASSAN, M.; ABDEL-REHIM, M. Development and validation of a liquid chromatography and tandem mass spectrometry

method for determination of roscovitine in plasma and urine samples utilizing on-line sample preparation. Journal of Chromatography B, v. 817, p. 303-307, 2005.

96. SARACINO, M. A.; PALMA, A.; BONCOMPAGNI, G.; RAGGI, M. A. Analysis of risperidone and its metabolite in plasma and saliva by LC with coulometric detection and novel MEPS procedure. Talanta, v. 81, p. 1547-1553, 2010.

97. EL-BEQQALI, A.; KUSSAK, A.; BLOMBERG, L.; ABDEL-REHIM, M. Microextraction in packed syringe/liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry for quantification of acebutolol and metoprolol in human plasma and urine samples. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v. 30, p. 575-586, 2007.

98. MIYAGUCHI, H.; IWATA, Y. T.; KANAMORI, T.; TSUJIKAWA, K;, KUWAYAMA, K.; INOUE, H. Rapid identification and qualification of methamphetamine and amphetamine in hair by gas chromatography/mass spectrometry coupled with micropulverized extraction, aqueous acetylation and microextraction by packed sorbent. Journal of Chromatography A. v. 1216, p. 4063-4070, 2009.

99. TAVARES, M. F. M.; Mecanismos de separação em eletroforese capilar. Química Nova, 20, 493-511, 1997.

100. BAKER, D. R.; Capillary Electrophoresis; John Wiley & Sons Inc.; New York, 53-93, 1995

101. PORRAS, S. P.; KENNDLER, E.; Are the asserted advantages of organic solvents in capillary electrophoresis real? A critical discussionElectrophoresis v. 26,p. 3203-3320, 2005.

102. PORRAS, S. P.; RIEKKOLA, M. L.; KENNDLER, E. The principles of migration and dispertion in capillary electrophoresis in nonaqueous solvents. Electrophoresis v.24, p.1485-1498, 2003.

103. HIMMELSBACH, M.; KLAMPFL, C. W.; BUCHBERGER, W.; . Development of an analytical method for the determination of antidepressants in water samples by capillary electrophoresis with electrospray ionization mass spectrometric detection. Journal of Separation Science,v. 28, p. 1735-1741, 2005.

104. CANTU, M. D.; HILLEBRAND, S.; CARRILHO, E.; Determination of the dissociation constants (pKa) of secondary and tertiary amines in organic media by capillary electrophoresis and their role in the electrophoretic mobility order inversion. Journal of Chromatography A v. 1068, p. 99 267, 2005.

105. STEINER, F.; HASSEL, M. Nonaqueous capillary electrophoresis: a versatile completion of electrophoretic separation techniques. Electrophoresis, v. 21, p. 3994-4016, 2000.

106. LI, X. Q.; UBOH, C. E.; SOMA, L. R.; GUAN, F. Y.; YOU, Y. W.; KAHLER, M.C.; JUDY, J. A.; LIU, Y.; CHEN, J. W. Simultaneous separation and confirmation of amphetamine and related drugs in equine plasma by non-aqueous capillary electrophoresis tandem mass spectrometry. Drug testing and analysis, v. 2, p. 70-81, 2010.

107. MORALES-CID, G.; CÁRDENAS, S.; SIMONET, B. M.; VALCÁRCEL, M.; Direct automatic determination of free and total anesthetic drugs in human plasma by use of a dual (microdialysis-microextraction by packec sorbent) sample treatment coupled at line to NACE-MS. Electrophoresis, v. 30, p. 1684-1691, 2009.

108. ACEDO-VALENZUELA, M. I.; GALEANO-DIAZ, T.; RODRIGUEZ, A. S.; MARTINEZ, R. C.; ALVAREZ, J. D. Development of a non-aqueous electrophoresis method for the simultaneous determination of tricyclic antidepressants in human serum. Electrophoresis, v. 30, p. 1052-1058, 2009.

109. CANTU, M. D.; HILLEBRAND, S.; QUEIROZ, M. E. C.; LANÇAS, F. M.; CARRILHO, E.; Validation of non-aqueous capillary electrophoresis for simultaneous determination of four tricyclic antidepressants in pharmaceutical

formulations and plasma samples. Journal of Chromatography B, v. 799, p. 127-132, 2004.

110. MADEJ, K.; KALA, M.; LC and non-aqueous CE determination of phenothiazines in autopsy samples. Chromatographia, v. 62, p. 533-538, 2005,

111. MADEJ, K.; WOZNIAKIEWICZ, M.; KALA, M. Method for screening and quantification of seven phenothiazines in whole blood samples by non-aqueous capillary electrophoresis Chromatographia v. 62, p. 259-263, 2005

112. RODRIQUEZ-FLORES, J.; NEVADO, J.J.B.; SALCEDO, A. M. C., DIAZ, M. P. C. Nonaqueous capillary electrophoresis method for the analysis of gleevec and its main metabolite in human urine Journal of Chromatography A, n. 1068, p. 175-182

113. FLORES, J. R.; NEVADO, J. J. B.; PENALVO, G. C.; DIEZ, N. M.; Development and validation method for determination of fluoxetine and its main metabolite norfluoxetine by nonaqueous capillary electrophoresis in human urine. Talanta v. 65, p. 163-171, 2005.

114. FLORES, J. R.; NEVADO, J. J. B.; SALCEDO, A. M. C.; DIAZ,, M. P. C.; Nonaqueous capillary electrophoresis method for the analysis of tamoxifen, imipramine and their main metabolites in urine. Talanta v. 65, p. 155-162, 2005.

115. ANDERSON, M. S.; LU, B.; ABDEL-REHIM, M.; BLOMBERG, S.; BLOMBERG, L. G. Utility of nononaqueous capillary electrophoresis for the determination of lidocaine and its metabolites in human plasma: a comparison of ultraviolet and mass spectrometric detection. Rapid communications in mass spectrometry, v. 18, p. 2612-2618, 2004.

116. FLORES, J. R.; NEVADO, J, J, B.; SALCEDO, A. M. C.; DÍAZ, M. P. C.; Non-aqueous capillary zone electrophoresis method for the analysis of paroxetine, tamoxifen, and their main metabolites in urine. Analytica Chimica Acta, v. 512, p. 287-295, 2004.

117. FLORES, J. R.; NEVADO, J. J. B.; SALCEDO, A. M. C.; DÍAZ, M. P. C.; Development and validation method for determination of paroxetine and its metabolites by nonaqueous capillary electrophoresis in human urine. Experimental design for evaluating the ruggedness of the method. Electrophoresis, v. 25, p. 454-462, 2004.

118. FANG, C.; CHUNG, Y. L.; LIU, J. T.; LIN, C. H.; Rapid analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine: a comparison of nonaqueous capillary electrophoresis/fluorescence detection with GC/MS. Forensic Science International, v. 125, p. 142-148, 2002.

119. CARTER, S. J.; LI, X. F.; MACKEY, J. R.; MODI, S.; HANSON, J.; DOVICHI, N.; Biomonitoring of urinary tamoxifen and its metabolites from breast

cancer patients using nonaqueous capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry. Electrophoresis, v. 22, p. 2730-2736, 2001.

120. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretória Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE no 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: HTTP://www.anvisa.gov.br Acesso em 23/08/2008.

121. Leite, F. Validação em análise química. Campinas, Editora Átomo LTDA, p. 124, 1996.

122. FRANCOTTE, E.; DAVATZ, A.; RICHERT, P.; Development and validation of chiral high-performance liquid chromatographic methods for the quantitation of valsartan and of the tosylate of valinebenzyl ester. Journal of Chromatography B, v.686, p,77-831996.

123. CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion. Journal of Chromatography B , v. 689, p. 175-180, 1997.

124. LANÇAS, F. M. Cromatografia em fase gasosa. São Carlos, SP, Acta, p. 254, 1993.

125. WILLE, S. M. R.; MAUDENS, K. E.; VAN PETEGHEM, C. H.; LAMBERT, W. E. E. Development of a solid phase extraction for 13 new generation antidepressants and their active metabolites for gas chromatographic-mass spectrometric analysis. Journal of Chromatography A,v. 1092, p. 19-29, 2005.

126. ÇHERKAOUI, S.; VENTHEY, J. C. Nonaqueous capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry for the analysis of fluoxetine and its related compounds. Electrophoresis, 23, 442-448, 2002.

127. PUCCI, V.; FANALI, S.; SABBIONI, C.; RAGGI, M. A.; Separation of Five recently commercialized selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants by capillary electrophoresis. Journal of Separation Science, v. 25, p. 1096-1100, 2002.

128. GROB, M.; STEINER, F.; Characteristics of the electroosmotic flow of electrolyte systems for nonaqueous capillary electrophoresis. Electrophoresis , v.23, n.12, p. 1853-1861, 2002.

129. DAVID, F.; TIEPONT, B.; SANDRA, P. Stir-bar sorptive extraction of trace organic compounds from aquous matrices. LCGC North America, v. 27, p. 108-114, 2003.

130. SANDRA, P.; TIENPONT, B.; VERCAMMEN, J.; TREDOUX, A.; SANDRA, T.; DAVID, D. Stir bar sorptive extraction applied to the determination of

dicarboximide fungicides in wine. Journal of Chromatography A, v. 929, p. 117-126, 2001.

131. BICCHI, C.; CORDERO, C.; RUBIOLO, P.; SANDRA, P. Impact of water/PDMS phase ratio, volume of PDMS, and sampling time on Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) recovery of some pestides with different $K_{o/w}$. Journal of Separation Science, v. 26, p. 1650-1656, 2003.

132. PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction: theory and practice. Wiley-VCH Inc, New York, USA, 1997, p. 53.

133. GATTI, G.; BONOMI, I.; MARCHISELLI, R.; FATTORE, C.; SPINA, E.; SCORDO, G.; PACIFICI, R.; PERUCCA, E.; Improved enantioselective assay for the determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by liquid chromatography. Journal of chromatography B, v. 784,p. 375-383, 2003.

134. CHAVES, A. R. Desenvolvimento da fase extratora SPME de poli(pirrol) e avaliação das técnicas SPME/LC e SBSE/LC para analyses de antidepressivos em amostras de plasma. Tese - Ribeirão Preto, 2008

135. ALTUN, Z.; ABDEL-REHIM, M. Study of the factors affection the performance of microextraction by packed sorbent (MEPS) using liquid

scintillation counter and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta, v. 630, p. 116-123, 2008.

136. SARACINO, M.A.; PALMA., A.; BONCOMPAGNI, G.; RAGGI, M. A. Analysis of risperidone and its metabolite in plasma and saliva by LC with coulometric detection and a novel MEPS procedure. Talanta, v. 81, p. 1547-1553, 2010.