FICHA CATALOGRÁFICA

Melo, Lidervan de Paula

Avaliação da fase extratora polidimetilsiloxano/polipirrol nas análises de antidepressivos em amostras de plasma, através das técnicas extração sortiva em barra de agitação e cromatografia líquida.

Ribeirão Preto, 2007.

140 p.30 cm

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

Orientadora: Queiroz, Maria Eugênia Costa

1. extração sortiva em barra de agitação 2. PDMS/PPY 3. cromatografia líquida 4. antidepressivos

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química**

Avaliação da fase extratora polidimetilsiloxano/polipirrol nas análises de antidepressivos em amostras de plasma, através das técnicas extração sortiva em barra de agitação e cromatografia líquida.

Lidervan de Paula Melo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Costa Queiroz

Dissertação 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 Mestre em Ciências, Área: Química

RIBEIRÃO PRETO - SP

2007

Quero dedicar este trabalho a duas pessoas maravilhosas, amigas e que são tudo na minha vida, os quais sempre me incentivaram a seguir o caminho dos estudos.

Lúcia de Fátima Melo (minha mãe)

e

José do Nascimento de Melo (meu pai)

"O senhor é meu pastor

e nada me faltará"

Salmo; 91.

AGRADECIMENTOS

- À Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Queiroz Nassur, por me conceder a oportunidade de realizar este trabalho, pelos seus valiosos ensinamentos e orientação.
- Ao Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças do Instituto de Química de São Carlos/USP, por sua colaboração no desenvolvimento da barra SBSE.
- À Prof^a. Dr^a. Regina Helena Costa Queiroz da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, pela doação das amostras de plasma.
- Aos amigos do laboratório de cromatografia: Andréa, Bruno, Fernanda e Ariane. Pela amizade durante todos os momentos e trocas de conhecimentos.
- Aos estimados e valiosos amigos: Denis Renato de Oliveira, Francisco Ferrarini e Adriana de Oliveira pelo apoio e amizade.
- Aos amigos da casa de Pós-graduação da USP: Ricardo (Ric), Ricardo (Bahia), Grace Kelly, Vânia, Fabrício, Camilo, Fernando, Jaqueline, Silvania, Douglas, Gláucia, Juliana.
- Às agências de fomento: CAPES E FAPESP, pelo suporte financeiro.

RESUMO

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. Em razão da complexidade dos fluidos biológicos e da baixa concentração dos fármacos nestas matrizes, a etapa de preparo de amostra, extração, pré-concentração dos analitos e eliminação dos interferentes, têm sido requerida para o desenvolvimento de métodos cromatográficos com alta sensibilidade e seletividade analítica.

A extração sortiva em barra de agitação (SBSE), recente técnica de preparo de amostra, baseia-se no equilíbrio de sorção do analito entre as fases: extratora (polidimetilsiloxano) e amostra aquosa. A fase extratora PDMS é a única disponível no mercado, o que tem limitado a sensibilidade e a seletividade analítica da técnica SBSE. O uso de polipirrol (PPY) como fase extratora está relacionado às diferentes interações de seus grupos funcionais (hidrofóbica, π - π , com o grupo funcional polar, troca iônica, ácido-básica, dipolo-dipolo e dipolo induzido-dipolo.) com os analitos. Neste trabalho, uma nova fase extratora SBSE, com o revestimento misto PDMS/PPY foi avaliada para análises de antidepressivos em amostras de plasma, por cromatografia líquida de alta eficiência.

A otimização das variáveis SBSE: tempo e temperatura de extração, tempo de dessorção e pH da matriz biológica, baseada no equilíbrio de sorção dos analitos entre as fases: polimérica (PDMS/PPY) e fluido biológico, permitiu a determinação dos analitos em concentrações plasmáticas que contemplam o intervalo terapêutico.

A presença de estrutura porosa (PPY) e não porosa (PDMS) na superfície polimérica da barra extratora SBSE-PDMS/PPY foi confirmada através de análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). De acordo, com os resultados obtidos nas análises de MEV e nas análises (individuais e simultâneas) de amostras de plasma enriquecidas com os analitos, os

mecanismos de retenção dos fármacos junto à superfície PDMS/PPY ocorreram através dos processos de adsorção (PPY) e absorção (PDMS).

A validação analítica foi realizada segundo as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. O método padronizado apresentou linearidade no intervalo de concentração plasmática que variou dos limites de quantificação a 500 ng mL⁻¹, coeficientes de determinação maiores que 0,994, precisão inter ensaios com coeficientes de variação menores que 15% e exatidão de 96% a 106%. Os valores de limites de quantificação obtidos são congruentes com a menor concentração plasmática do intervalo terapêutico preconizado.

O método SBSE-PDMS/PPY padronizado e validado foi utilizado para determinações dos antidepressivos, sertralina, duloxetina e fluoxetina em amostras de plasma de pacientes, em terapia com estes fármacos. Desta forma, o método SBSE-PDMS/PPY poderá ser empregado para fins de monitorização terapêutica.

SUMMARY

Therapeutic drug monitoring has been described a valuable clinical resource for the customization of the dosage regimen, in accordance with the drug concentration and/or its biotransformation products, in of plasma or serum samples, collected on the basis of clinical context and pharmacokinetics principles. Due the complexity of biological fluids and the low concentration of the drug in these matrices, an stage of sample preparation, extraction, pre-concentration of the analytes and elimination of the interferents has been required for the development of chromatographic methods with high sensitivity and analytical selectivity.

Stir bar sorptive extraction (SBSE), a recent sample preparation technique, is based on the sorption equilibrium of the analytes between the polydimethylsiloxane (PDMS) and aqueous phases. PDMS is the only commercially available extraction phase (SBSE), which has limited the analytical sensitivity and the selectivity of the SBSE technique. The use of polypyrrole (PPY) as extraction phase is related to the different interactions of its functional groups (π - π interactions, polar groups interactions, acid-base, dipole-dipole, dipole-induced-dipole) and the analytes. In this work, a new SBSE extraction phase, with a PDMS/PPY coating was evaluated for the analysis of antidepressants in plasma samples by High Performance Liquid Chromatography.

The optimization of the SBSE variables extraction time and temperature, desorption time and pH of the biological matrix based on the sorption equilibrium of the analytes between the polymeric (PDMS/PPY) and biological fluid phases, allowed determination of the analytes in plasmatic concentrations that correspond to the therapeutic interval.

The presence of a porous structure (PPY) as well as no none, porous (PDMS), on the polymeric surface of SBSE-PDMS/PPY was confirmed by Scanning Electron Microscopy (SEM) analyses. In agreement with the results obtained by SEM analyses and individual and simultaneous analyses of the plasma samples spiked with the analytes, the mechanisms of drugs retention on the surface of PDMS/PPY occur through adsorption (PPY) and absorption (PDMS).

Analytical validation was carried through according to the norms of the National Agency of Sanitary Vigilance. The standardized method presented linearity in the plasmatic interval concentrations that varied from the limits of quantification to 500 ng mL⁻¹, the determination coefficients were higher than 0.994, inter precision assays with coefficients of variation lower than 15%, and accuracy from 96% to 106%. The quantification value limits were in agreement with the lowest plasmatic concentration of the established therapeutical interval.

The standardized and validated SBSE-PDMS/PPY method was used for determination of sertraline, duloxetine and fluoxetine in plasma patient samples under therapy with these drugs. Thus, the SBSE-PDMS/PPY method could be used for therapeutic drug monitoring.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Mecanismo de ação dos antidepressivos.....	3
Figura 2:	Estruturas química dos antidepressivos ISRSs: (a) citalopram, (b) sertralina, (c) fluoxetina e (d) paroxetina.....	5
Figura 3:	Estrutura química da mirtazapina.....	6
Figura 4:	Estrutura química da duloxetina.....	7
Figura 5:	Etapas de extração líquido-líquido.....	10
Figura 6:	Cartuchos de extração em fase sólida.....	11
Figura 7:	Representação esquemática do aparato SPME.	13
Figura 8:	(a) Extração SPME, (b) dessorção térmica SPME para análise por GC, (c) dessorção utilizando a interface do LC.....	14
Figura 9:	Processo de dessorção “off line” SPME.....	15
Figura 10:	Barra de extração sortiva com revestimento PDMS.....	18
Figura 11:	Estrutura química do polidimetilsiloxano (PDMS).....	19
Figura 12:	Processo de extração SBSE.....	19
Figura 13:	(a) dessorção térmica, (b) dessorção líquida.....	20
Figura 14:	Taxa de recuperação dos analitos em função do coeficiente de partição octanol-água ($K_{o/w}$) para as técnicas, SPME (10 mL amostra, fibra PDMS, 100 μ m de espessura) e SBSE (10 mL amostra, camada de PDMS 10 mm x 0,5 mm).....	23
Figura 15:	Partículas ADS.....	31

Figura 16:	Cadeia polimérica de Polipirrol.....	32
Figura 17:	Mecanismo de extração, absorção e adsorção.....	35
Figura 18:	Estrutura química das fases estacionárias: (a) monomérica e (b) polimérica.....	39
Figura 19:	Célula do detector de ultravioleta.....	40
Figura 20:	Detector de UV de comprimento de onda variável.....	41
Figura 21:	Esquema de um detector de rede de diodos.....	42
Figura 22:	Barra SBSE revestida com PDMS/PPY.....	51
Figura 23:	Cromatograma referente à análise da solução padrão dos antidepressivos (500 ng mL^{-1}): 1- mirtazapina, 2 - citalopram, 3 - paroxetina, 4 - duloxetina, 5 - fluoxetina, 6 - sertralina e 7 – clomipramina (P.I.). (a) fase móvel: solução tampão acetato ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5): acetonitrila:metanol (60:37:3, v/v/v). (b) fase móvel: solução tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 3,8 e acetonitrila (53:47 v/v)	61
Figura 24:	Estrutura química da clomipramina.....	65
Figura 25:	Otimização do tempo e temperatura de extração para o antidepressivo mirtazapina.....	67
Figura 26:	Otimização do tempo e temperatura de extração para o antidepressivo citalopram.....	67
Figura 27:	Otimização do tempo e temperatura de extração para o antidepressivo paroxetina.....	68
Figura 28:	Otimização do tempo e temperatura de extração para o antidepressivo duloxetina.....	68
Figura 29:	Otimização do tempo e temperatura de extração para o antidepressivo fluoxetina.....	69
Figura 30:	Otimização do tempo e temperatura de extração para o antidepressivo sertralina.....	69

Figura 31:	Otimização do tempo e temperatura de extração para o antidepressivo clomipramina.....	70
Figura 32:	Otimização do pH da amostra para as análises SBSE/LC.....	72
Figura 33:	Otimização do tempo de dessorção SBSE.....	73
Figura 34:	Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (a) barra de PDMS/PPY (b) barra de PDMS.....	75
Figura 35:	Análise individual e simultânea para o antidepressivo (a) citalopram e (b) duloxetina, com a barra de PDMS/PPY e PDMS.....	76
Figura 36:	(a) cromatograma da amostra de plasma branco de referência .(b) cromatograma da análise dos antidepressivos extraídos da amostra de plasma branco de referência enriquecida com os antidepressivos (1- mirtazapina, 2 - citalopram, 3 - paroxetina, 4 - duloxetina, 5 - fluoxetina, 6 -sertralina e 7-clomipramina), concentração de 500 ng mL ⁻¹	79
Figura 37:	Curva analítica para o antidepressivo mirtazapina.....	81
Figura 38:	Curva analítica para o antidepressivo citalopram.....	82
Figura 39:	Curva analítica para o antidepressivo paroxetina.....	82
Figura 40:	Curva analítica para o antidepressivo duloxetina.....	83
Figura 41:	Curva analítica para o antidepressivo fluoxetina.....	83
Figura 42:	Curva analítica para o antidepressivo sertralina.....	84

Figura 43:	Cromatogramas referentes as análise SBSE/LC de amostras de plasma de pacientes depressivos (a) duloxetina (434.8 ng mL^{-1}), (b) fluoxetina (398.7 ng mL^{-1}) e (c) sertralina ($554,0 \text{ ng mL}^{-1}$).....	90
Figura 44:	Curva de regressão linear para o antidepressivo fluoxetina. As linhas tracejadas representam o limite de confiança de 95%.....	92
Figura 45:	Curva de regressão linear para o antidepressivo citalopram. As linhas tracejadas representam o limite de confiança de 95%.....	93
Figura 46:	Curva de regressão linear para o antidepressivo mirtazapina. As linhas tracejadas representam o limite de confiança de 95%.....	93
Figura 47:	Curva de regressão linear para o antidepressivo sertralina. As linhas tracejadas representam o limite de confiança de 95%.....	94
Figura 48:	Curva de regressão linear para o antidepressivo paroxetina. As linhas tracejadas representam o limite de confiança de 95%.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Aplicação SBSE em amostras ambientais.....	28
Tabela 2:	Aplicação SBSE em amostras de alimentos.....	29
Tabela 3:	Composição das fases móveis avaliadas.....	49
Tabela 4:	Ordem de eluição dos fármacos e seus respectivos tempos de retenção, com a fase móvel selecionada.....	62
Tabela 5:	Cálculo do fator de retenção e resolução cromatográfica para os cromatogramas A e B.....	64
Tabela 6:	Tempo de retenção dos fármacos analisados.....	80
Tabela 7:	Regressão linear, LQ e LD para o método SBSE/LC.....	85
Tabela 8:	Precisão inter ensaios e exatidão para o método SBSE/LC em amostras de plasma.....	87
Tabela 9:	Valores das taxas de recuperação relativos e absolutos obtidas.....	88
Tabela 10:	Comparação dos valores de recuperação relativa e limite de quantificação para os métodos SBSE-PDMS/PPY e SBSE-PDMS.....	91
Tabela 11:	Equação de regressão linear, coeficiente de correlação (r) no limite de confiança de 95% para as amostras de plasma enriquecidas com os antidepressivos (50 a 500 ng mL ⁻¹).....	95

LISTA DE SIGLAS

ADTs	Antidepressivos tricíclicos
ISRSs	Antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina
LC-FD	Cromatografia líquida com detector de fluorescência
LC-UV	Cromatografia líquida com detector de ultravioleta
LC-MS	Cromatografia líquida com espectrômetro de massas
LC/DAD	Cromatografia líquida com arranjo de diodos
SPME	Microextração em fase sólida
GC - FID	Cromatografia Gasosa com detector de ionização de chamas
CG	Cromatografia gasosa
PDMS	Polidimetilsiloxano
PA	Poliacrilato
PDMS-DVB	Polidimetilsiloxano – divinilbenzeno
CW-DVB	Carbowax – divinilbenzeno
CW-TPR	Carbowax – resina “templated”
SBSE	Extração sortiva em barra de agitação
TD-GC-MS	Dessorção térmica e cromatografia gasosa acoplada com detector de massas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
ADS	Alquil-diol sílica
RAM	Material de Acesso Restrito
PPY	Polipirrol
RPLC	Cromatografia líquida em fase reversa
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
LQ	Limite de quantificação
LD	Limite de quantificação
PDMS/PPY	Polidimetilsiloxano/polipirrol
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Depressão.....	1
1.2 Antidepressivos.....	2
1.2.1 Antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs).....	3
1.2.2 Antidepressivo noradrenérgico e específico serotoninérgico.....	6
1.2.3 Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina e da Noradrenalina.....	7
1.3 Monitorização terapêutica.....	8
1.4 Métodos analíticos.....	9
1.4.1 Métodos de preparo de amostras.....	9
1.4.2 Microextração em fase sólida (SPME).....	12
1.4.3 Extração sortiva em barra de agitação (SBSE).....	17
1.4.3.1 Princípios teóricos.....	21
1.4.3.2 Otimização das variáveis SBSE.....	23
1.4.3.2.1 Tempo e temperatura de extração.....	26
1.4.3.2.2 pH da matriz biológica.....	24
1.4.3.2.3 Otimização do processo de dessorção.....	25
1.4.3.3 Aplicações do método SBSE.....	25
1.4.3.4 Desenvolvimento de novas fases extratoras para SBSE	30
1.4.4 Polipirrol como fase extratora.....	32
1.4.5 Mecanismos de extração.....	33
1.5 Cromatografia líquida em fase reversa.....	35
1.5.1 Fases estacionárias quimicamente ligadas.....	38

1.5.2 Cromatografia por supressão iônica.....	39
1.5.3 Detectores de ultravioleta.....	40
1.6 Validação analítica.....	42
1.6.1 Especificidade/Seletividade.....	43
1.6.2 Linearidade.....	43
1.6.3 Precisão.....	44
1.6.4 Exatidão.....	44
1.6.5 Limite de quantificação (LQ).....	45
1.6.6 Limite de detecção (LD).....	45
1.6.7 Recuperação.....	56
2 OBJETIVOS.....	47
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
3.1 Padrões analíticos e reagentes.....	48
3.2 Otimização das condições cromatográficas LC-UV...	47
3.3 Desenvolvimento da barra SBSE com revestimento de PDMS/PPY.....	50
3.4 Amostras de plasma.....	51
3.5 Otimização das variáveis SBSE para análise dos antidepressivos.....	52
3.6 Estudo do mecanismo adsorção/absorção de extração	53
3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	54
3.8 Validação analítica.....	54
3.9 Comparação das metodologias SBSE utilizando as barras de PDMS e PDMS/PPY.....	59
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1 Análise cromatográfica LC-UV/DAD.....	59
4.1.1 Otimização da fase móvel.....	59
4.1.2 Identificação e quantificação dos fármacos.....	64
4.2 Padronização do método SBSE/LC-UV para análise simultânea de antidepressivos.....	66

4.2.1 Otimização das variáveis SBSE.....	66
4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	74
4.4 Validação analítica do método SBSE/LC padronizado	78
4.4.1 Especificidade/seletividade.....	78
4.4.2 Linearidade.....	81
4.4.3 Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)	84
4.4.4 Precisão inter ensaios e exatidão.....	86
4.4.5 Recuperação absoluta e relativa.....	88
4.5 Análise de amostras de plasma de pacientes: aplicação do método SBSE/LC.....	89
4.6 Comparação das metodologias SBSE-PDMS/PPY e SBSE-PDMS com a barra comercial	91
5 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	96
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 Depressão

Cerca de 6% da população tem apresentado depressão, sendo três vezes mais freqüente em mulheres. A depressão tem sido manifestada em todas as idades, mas na adolescência e nos primeiros anos da juventude são os períodos de maior prevalência. Nos homens a depressão tem sido manifestada, geralmente, na faixa etária de 35 a 44 anos. Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2020, as doenças coronárias e a depressão serão as principais causas mundiais de mortalidade. ¹

A depressão é o resultado de uma modificação da ação de neurotransmissores no cérebro. A sinapse (comunicação entre os neurônios) é a base do funcionamento do sistema nervoso central. No seu estado normal, os neurônios (células nervosas) liberam neurotransmissores, que são capturados por outros neurônios por meio de seus receptores. Dentro da célula nervosa, uma bomba de recaptação retira parte destes neurotransmissores da sinapse e uma enzima específica metaboliza estas substâncias. ¹⁻³

Quando há depressão, ocorre uma diminuição na quantidade de neurotransmissores liberados, porém a bomba de recaptação e a enzima específica continuam trabalhando normalmente. Logo o neurônio receptor captura menos neurotransmissores e passa a funcionar mais lentamente. ¹⁻³

Os sintomas mais comuns relacionados à depressão, têm sido os emocionais: desânimo, ansiedade, perda de interesse ou prazer, sentimentos

de culpa, comportamento suicidas e transtornos cognitivos e físicos: agitação, alterações de peso, dores musculares, perda de energia e alterações do sono.³

1.2 Antidepressivos

O desenvolvimento dos antidepressivos no final da década de 50 tornou a depressão plausível de tratamento, semelhante a outras doenças como o diabetes e a hipertensão arterial. Os antidepressivos aumentam a concentração de neurotransmissores na fenda sináptica por meio da inibição do metabolismo, bloqueio de recaptura neuronal ou atuação em autoreceptores pré-sinápticos (Figura 1).¹⁻⁴

Os antidepressivos podem ser classificados de acordo com a estrutura química ou propriedades farmacológicas. A estrutura cíclica caracteriza os antidepressivos heterocíclicos (tricíclicos e tetracíclicos). Os antidepressivos tricíclicos (ADTs) se dividem em dois grandes grupos: as aminas terciárias (imipramina, amitriptilina, trimipramina e doxepina) e as aminas secundárias (desmetilimipramina, nortriptilina e protriptilina).¹⁻⁴

Os ADTs, embora eficazes e ainda muito utilizados, apresentavam vários efeitos adversos, tais como: anticolinérgicos, cardiovasculares, neurológicos e gastrintestinais, causados em decorrência de sua ação farmacológica, podendo ser potencialmente letais em casos de superdosagem.

Nas últimas duas décadas surgiram novas classes de antidepressivos a partir da pesquisa de moléculas desprovidas dos efeitos colaterais dos heterocíclicos, os quais têm sido classificados em função de ação farmacológica, pois não compartilham estruturas comuns.¹⁻⁴

Entre os antidepressivos da nova geração, podemos destacar os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (citalopram, paroxetina, fluoxetina e sertralina), noradrenérgico e específico serotoninérgico (mirtazapina) e inibidores seletivos da recaptação da serotonina e da noradrenalina (duloxetina).

Figura 1: Mecanismo de ação dos antidepressivos.³

1.2.1 Antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs)

Os ISRSs: citalopram, sertralina, fluoxetina e paroxetina (Figura 2) apresentam eficácia clínica comparável aos clássicos ADTs, porém destituídos dos efeitos anticolinérgicos e cardiovasculares. Embora todos os ISRSs apresentem o mesmo mecanismo de ação, as diferenças entre as estruturas

moleculares fazem com que os diferentes fármacos possuam distintos perfis farmacocinéticos.^{1,4,5}

Todos os ISRSs apresentam alta ligação protéica. A fluoxetina apresenta metabólito com atividade clínica significativa, inibição da recaptação de serotonina e inibição de isoenzimas do citocromo P 450, a norfluoxetina.

A paroxetina e a fluoxetina apresentam perfil farmacocinético não linear, são rapidamente absorvidos, ligam-se fortemente às proteínas plasmáticas, deslocam outros fármacos da ligação protéica, aumentando seu nível plasmático.^{1,4,5}

O citalopram e a sertralina têm sido eficazes no tratamento de transtornos de ansiedade social e desordem do pânico. A sertralina é pouco absorvida através da administração oral e a taxa de absorção não é proporcional à dose administrada. O citalopram é rapidamente absorvido após administração oral, atingindo a concentração plasmática máxima em aproximadamente três horas (1-6 horas).^{1, 4}

As concentrações plasmáticas terapêuticas recomendadas têm sido de 15 a 1000 ng mL⁻¹ para a 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.⁶

Figura 2: Estruturas química dos antidepressivos ISRSs: (a) citalopram, (b) sertralina, (c) fluoxetina e (d) paroxetina.

1.2.2 Antidepressivo noradrenérgico e específico serotoninérgico

O mecanismo de ação da mirtazapina (Figura 3) ocorre através do aumento da atividade noradrenérgico e serotoninérgica central. Apresenta alta ligação às proteínas plasmáticas (85%). Os picos plasmáticos são atingidos em cerca de duas horas, e o estado de equilíbrio em cinco dias. Este fármaco apresenta relação linear com a dose administrada.

A mirtazapina sofre metabolização hepática, principalmente desmetilação e hidroxilação, seguida de conjugação ao ácido glucurônico. Seus metabólitos são ativos, encontrados em níveis baixos, os quais são eliminados na urina (75%) e nas fezes (15%). A meia vida de eliminação é de 20 a 40 horas.^{1,4,7}

Figura 3: Estrutura química da mirtazapina.

1.2.3 Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina e da Noradrenalina

O mecanismo de ação da duloxetina (Figura 4) no tratamento da depressão maior está ligado à inibição da recaptação neuronal de serotonina e de noradrenalina, assim como ao aumento na neurotransmissão serotoninérgica e noradrenérgica no sistema nervoso central.^{1,4,8}

A duloxetina bloqueia fortemente a recaptação de serotonina e de noradrenalina, e fracamente a captação de dopamina, com baixa ou nenhuma afinidade com os receptores dopaminérgicos, histaminérgicos, colinérgicos e adrenérgicos.^{1,8}

A duloxetina atinge as concentrações plasmáticas máximas em cerca de seis horas, é altamente ligada às proteínas e, depois de metabolizada, é excretada principalmente na urina, junto com seus metabólitos, após aproximadamente 12 horas.^{1, 8}

Figura 4: Estrutura química da duloxetina.

1.3 Monitorização terapêutica

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.^{9,10}

O objetivo da monitorização terapêutica é assegurar a eficácia e minimizar os efeitos adversos dos fármacos, prescritos na clínica. Os fármacos monitorados têm 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.^{9,10}

A monitorização terapêutica também tem sido aplicada a fármacos de baixo índice terapêutico, alta variabilidade interindividual na farmacocinética e em casos de resposta clínica que não sejam facilmente ou imediatamente mensuráveis.^{9,10}

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 com outras drogas administradas, nos casos do paciente apresentar patologias associadas capazes de alterar a disposição do fármaco, ou ainda nas situações de mudanças na formulação.^{9,10}

1.4 Métodos analíticos

1.4.1 Métodos de preparo de amostras

Em razão da complexidade dos fluidos biológicos e da baixa concentração dos fármacos nestas matrizes, a etapa de preparo de amostra: extração, pré-concentração dos analitos e eliminação dos interferentes, têm sido requeridas para o desenvolvimento de métodos cromatográficos com alta sensibilidade e seletividade analítica.^{11,12}

Os métodos convencionais, empregados no preparo de amostras biológicas para análises de antidepressivos por técnicas cromatográficas, tem sido a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida.^{11,12}

Na extração líquido-líquido ocorre a partição dos analitos entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa) (Figura 5). A eficiência da extração depende da afinidade do analito pelo solvente orgânico, ou seja, do coeficiente de partição, do volume de solvente, assim como do número de extrações.¹²

Esta técnica apesar de sua simplicidade e altas taxas de recuperação apresenta algumas desvantagens, tais como: os analitos com alta afinidade pela fase aquosa são parcialmente extraídos pelo solvente orgânico, formação de emulsão entre as fases resultando em perda do analito, consumo de solvente orgânico e exposição dos analistas a compostos tóxicos.^{12,13}

Figura 5: Etapas envolvidas na extração líquido-líquido. ¹²

Bringuenti *et al* ¹⁴ analisaram mirtazapina e seu metabólito, *N*-desmetilmirtazapina. As amostras foram extraídas em 4 mL de tolueno e as análises realizadas em um cromatógrafo líquido com detector de fluorescência (LC-FD). Os valores de recuperações foram 77% e 66%, respectivamente.

Queiroz *et al.*¹⁵ analisaram antidepressivos em amostras de plasma por cromatografia líquida com detector de ultravioleta (LC-UV). Os valores de recuperação média variaram de 59% a 86%. Os coeficientes de variação foram menores que 10% e o limite de quantificação variou de 2,5 a 10 ng mL⁻¹ para todos os antidepressivos analisados.

A extração em fase sólida é uma técnica de separação líquido - sólido, a qual utiliza cartuchos de extração que contêm a fase sólida (Figura 6).

Figura 6: Cartuchos de extração em fase sólida. ¹⁶

Após uma etapa de condicionamento, a solução contendo o analito é colocada no topo do cartucho e depois de drenada a fase líquida, o analito retido no cartucho é eluído com pequeno volume de solvente com aplicação de vácuo. Se houver contaminantes que possam interferir na análise, uma lavagem para eliminação dos interferentes precede a eluição. ^{13,16}

As desvantagens desta técnica estão relacionadas com o bloqueio dos poros da fase extratora pelos componentes da matriz, variações analíticas entre cartuchos extratores e necessidade de várias etapas operacionais para sua execução. ¹⁶

Juan et al.¹⁷ analisaram fluoxetina, citalopram, paroxetina e venlafaxina em amostra de plasma utilizando cromatografia líquida com espectrometria de massas (LC-MS). A recuperação média obtida foi maior ou igual a 73,2% para todos os antidepressivos analisados. O coeficiente de variação foi menor que 15% e o limite de detecção variou de 0,1 a 0,5 ng/mL.

Raggi *et al*¹⁸ desenvolveram um método para análise de fluoxetina e seu principal metabólito, norfluoxetina, em amostras de plasma por cromatografia líquida com arranjo de diodos (LC/DAD). Os valores de recuperação absoluta obtidos foram de 94% e 93% e os valores de coeficientes de variação de 2,1 e 3,2%, respectivamente.

Uma tendência predominante na área de química analítica são as técnicas miniaturizadas, pois não requerem instrumentação analítica sofisticada, utilizam pequenas quantidades de solvente orgânico, rápido processo operacional, permitem automação das análises, a reutilização das fases extratoras e integram em um único sistema, a extração, concentração e introdução da amostra no sistema cromatográfico.¹⁹

1.4.2 Microextração em fase sólida (SPME)

No final da década de 90, Pawliszyn e colaboradores desenvolveram a técnica de microextração em fase sólida (SPME).²⁰⁻²²

O dispositivo de SPME consiste de um amostrador (uma espécie de seringa) com uma fibra de sílica fundida revestida com um fino filme de um polímero ou de um adsorvente sólido (fase extratora), Figura 7.²⁰⁻²²

Figura 7: Representação esquemática do aparato SPME. ¹⁹

A SPME é um processo baseado no equilíbrio de partição entre as fases: aquosa (amostra homogênea), polimérica extratora (fibra) e gasosa. Durante a extração em um sistema trifásico considerado ideal (Figura 8a), os analitos migram entre as três fases até que o equilíbrio de partição seja atingido. Desta forma, a massa extraída do analito pela fibra está relacionada ao equilíbrio de massas nas fases do sistema. ²⁰⁻²²

A seleção do modo de extração depende da composição da amostra e da volatilidade do analito. Os dois principais modos em SPME têm sido a extração direta e a extração na fase gasosa (“headspace”). No modo direto, a fibra

revestida é inserida diretamente à amostra e os analitos através da difusão são transportados da amostra para a fase extratora, já na extração em fase gasosa, ou no *headspace* do frasco ocorre partição dos analitos voláteis entre a fase gasosa e a matriz da amostra^{21,22}.

Após o processo SPME, os analitos sorvidos na fase polimérica da fibra têm sido determinados por diferentes técnicas analíticas. Em análises realizadas por cromatografia gasosa (SPME-CG), a fibra é inserida no injetor aquecido e os analitos são dessorvidos termicamente para a coluna cromatográfica (Figura 8b).^{21,22}

Figura 8: (a) Extração SPME, (b) dessorção térmica SPME para análise por GC, (c) dessorção utilizando a interface do LC.²³

O acoplamento SPME com a cromatografia líquida requer uma interface apropriada, em forma de um T, onde a fibra é inserida na extremidade superior e as demais extremidades, lateral e inferior, são conectadas à válvula 6 pórticos do LC (Figura 8c). A dessorção dos analitos poderá ser realizada com a fase móvel no modo dinâmico ou no modo estático. Neste último modo, a fibra, anterior a eluição dos analitos para a coluna cromatográfica, permanece na interface em contato com um volume de fase móvel ou de solvente orgânico durante um intervalo de tempo, para dessorção dos analitos.^{24,25}

Queiroz *et al*²⁷ descreveram um simples sistema SPME/LC com dessorção “off line”, o qual não requer a utilização de interface, para a determinação simultânea de lamotrigina, carbamazepina e 10, 11 epóxido carbamazepina em amostras de plasma (Figura 9).

Figura 9: Processo de dessorção “off line” SPME.

As fases extratoras polidimetilsiloxano (PDMS), com filmes de diferentes espessuras (7, 30 e 100 μm), poliacrilato (PA) com 85 μm , polidimetilsiloxano – divinilbenzeno (PDMS-DVB) com 60 e 65 μm , carboxen – polidimetilsiloxano com 75 μm , carbowax – divinilbenzeno (CW–DVB) com 65 μm e carbowax – resina “templated” (CW-TPR), compõem as principais fibras disponíveis comercialmente.

A espessura da fase extratora e a constante de partição determinam à sensibilidade do método e o tempo de extração. A fase com maior espessura oferece aumento de sensibilidade, no entanto, requer maior tempo para atingir o equilíbrio de partição. Quanto maior a afinidade do analito com a fibra, maior será o coeficiente de partição, com isto maior a sensibilidade do método.²⁸

As fibras, CW-DVB, PDMS, PDMS-DVB e PA foram avaliadas para a análise de “carphedon” (composto por grupos polares como cetona e amina) em amostras de urina. A fibra CW-DVB apresentou maior eficiência de extração, no entanto, quando utilizadas as fibras PDMS-DVB e PA, o fármaco não foi detectado, e apresentou baixos valores de recuperação com a fibra PDMS.²⁹

As anfetaminas em amostras de urina, quando extraídas com a fibra PDMS (100 μm), obteve-se maiores taxas de recuperação, quando comparados com os valores obtidos usando as fibras PDMS (7 μm) e PA (85 μm) demonstrando, desta forma, a influência da polaridade e espessura da fase na eficiência de extração.³⁰

As fases das fibras não são trocadores de íons; SPME extrai somente espécies quimicamente neutras presentes na amostra. Os ácidos fracos e bases poderão ser convertidos a sua forma neutra, na qual poderão ser

extraídos através da fibra SPME. Lord *et al*³¹ compararam a concentração de metanfetamina extraída de amostras de urina em pH alcalino, ajustado com solução de hidróxido de potássio e com tampão fosfato. Foram observados significativos desvios na linearidade do método em sistema não tamponado.

O efeito do pH da amostra (urina) na eficiência do processo de extração de benzodiazepínicos foi avaliado usando três diferentes valores (tampão fosfato de sódio com pH 2,1; 6,8 e tampão borato de sódio pH 9,1). A maior parte dos benzodiazepínicos (bases fracas) apresentam-se na forma não dissociada em pH neutro e alcalino como 6,8 e 9,1, resultando em maior eficiência de extração.³¹

A fibra SPME revestida com polidimetilsiloxano (PDMS), devido sua estabilidade, tem sido a mais utilizada. Esta, quando revestida com 100 µm PDMS resulta em aproximadamente 0,5 µL de fase extratora. Conseqüentemente, a eficiência da extração para fármacos parcialmente solúveis em água pode ser bem baixa. Para compostos muito apolares ocorrerá à distribuição dos analitos entre a fase aquosa, a fibra SPME, a parede de vidro do tubo de extração, e a superfície do politetrafluoroetileno da barra magnética usada para agitar as amostras.^{21,22}

1.4.3 Extração sortiva em barra de agitação (SBSE)

Baseando-se nas observações descritas, Cramers *et al*³² desenvolveram uma nova técnica de preparo de amostra denominada de extração sortiva em barra de agitação (SBSE), para extração de compostos orgânicos de matrizes aquosas.

A barra de extração sortiva apresenta uma haste magnética, necessária para agitar a solução da amostra, a qual é inserida no interior de um tubo de vidro de pequeno diâmetro, este é recoberto por uma camada de polidimetilsiloxano de 1 mm de espessura, para sorção dos analitos (Figura 10).^{32,33}

O polidimetilsiloxano (Figura 11) tem sido muito utilizado como fase extratora ou como fase estacionária em colunas de cromatografia gasosa, em razão da estabilidade térmica (-20 a 320°C), baixo ruído instrumental e não promove a decomposição dos analitos presentes na análise.³³

Figura 10: Barra de extração sortiva com revestimento PDMS.

Figura 11: Estrutura química do polidimetilsiloxano (PDMS).

As variáveis da técnica da SBSE, tais como: temperatura de extração, tempo de extração, pH e força iônica da amostra e processo de dessorção devem ser otimizados para obtenção de adequada sensibilidade analítica em menor tempo de análise.^{32,34}

A extração sortiva em barra de agitação é realizada através da introdução da barra SBSE em frasco de vidro ou em tubo de extração contendo a amostra (Figura 12). A amostra é agitada durante um intervalo de tempo de 30 a 40 minutos. Após a extração, a barra de agitação é removida da amostra aquosa e seca em papel seco, para remover as gotas da água.^{32,34}

Figura 12: Processo de extração SBSE.³⁴

Para o processo de dessorção de compostos voláteis, a barra SBSE é inserida em um tubo de vidro para dessorção térmica no injetor do cromatógrafo a gás (Figura 13a), onde os analitos são termicamente

dessorvidos. Posteriormente são concentrados a baixas temperaturas e transportados para a coluna com aumento gradual da temperatura do injetor.

Para as análises de compostos não voláteis, a barra SBSE pode ser colocada num frasco contendo pequeno volume de solvente orgânico ou fase móvel, compatível com a fase polimérica extratora, para dessorção líquida (Figura 13b).³⁵

(a)

(b)

Figura 13: (a) dessorção térmica³⁵, (b) dessorção líquida.

1.4.3.1 Princípios teóricos

A extração sortiva em barra de agitação baseia-se no de equilíbrio partição dos analitos entre as fases: extratora (PDMS) e amostra aquosa ($K_{PDMS/W}$). O equilíbrio de partição tem sido correlacionado com o coeficiente de distribuição octanol-água ($K_{O/W}$), o qual estima a medida da polaridade dos compostos orgânicos e fornece uma boa indicação da eficiência de extração para cada analito.³³

O coeficiente de partição do analito entre as fases PDMS e aquosa ($K_{PDMS/W}$) é definido como sendo a razão entre a concentração do analito na fase de PDMS (C_{PDMS}) e a concentração do analito na amostra aquosa (C_w), no equilíbrio. Esta razão é igual ao produto entre razão das 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 1.³³

$$K_{o/w} \approx K_{PDMS/w} = \frac{C_{PDMS}}{C_w} = \frac{m_{PDMS}}{m_w} \cdot \frac{V_w}{V_{PDMS}} = \frac{m_{PDMS}}{m_w} \cdot \beta \quad \text{Equação 1}$$

A taxa de recuperação do processo de extração, equação 2, é expresso pela razão entre a quantidade de analito extraído (m_{PDMS}) e a quantidade inicial de analito na amostra aquosa ($m_o = m_{PDMS} + m_w$) que corresponde às correlações entre $K_{PDMS/w}$ e β , como ilustra a equação 2:³³

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

Equação 2

Segundo a equação 2, quanto maior a quantidade de PDMS, menor o β , maior será a eficiência de extração. Uma vez que o valor de $K_{PDMS/w}$ é similar ao valor de $K_{o/w}$, a eficiência da extração em PDMS, em geral diminui com o aumento da polaridade do analito.³³

A fase extratora PDMS é a mesma fase usada nas fibras SPME, no entanto a quantidade de revestimento utilizada é 50 a 250 vezes maior, o que resulta em taxas de recuperação mais elevadas e maior capacidade de amostra.

Para SPME, o volume do PDMS é de aproximadamente 0,5 μL . Isso resulta em recuperações não eficientes para solutos com baixos valores de coeficiente de distribuição octanol/água ($K_{o/w}$). Na extração sortiva em barra de agitação, são usados revestimentos de PDMS de 25 a 125 μL . A eficiência da extração, teoricamente alcança 100% para solutos com valores de $K_{o/w}$ maiores que 500.^{33,36}

Segundo a Figura 14, a taxa de recuperação da técnica SBSE aproxima-se a 100% para solutos com valores de $K_{o/w}$ maiores que 500, enquanto que a técnica SPME apresenta satisfatória taxa de recuperação para analitos com valores de $K_{o/w}$ maior que 10^5 .^{33,36}

Figura 14: Taxa de recuperação dos analitos em função do coeficiente de partição octanol-água ($K_{o/w}$) para as técnicas, SPME (10 mL amostra, fibra PDMS, 100 μ m de espessura) e SBSE (10 mL amostra, camada de PDMS 10 mm x 0,5 mm).³³

1.4.3.2 Otimização das variáveis SBSE

1.4.3.2.1 Tempo e temperatura de extração

Com o aumento da temperatura, o coeficiente de difusão aumenta e o coeficiente de partição do analito entre as fases aquosa e extratora diminui. Estas variações nos coeficientes de difusão e de partição terão influências opostas sobre a extração. Em decorrência do aumento do coeficiente de difusão, o tempo requerido para que o analito atinja o equilíbrio de sorção deverá ser menor. Por outro lado, devido à diminuição do coeficiente de

partição, a quantidade de massa extraída no equilíbrio de sorção será menor, acarretando em perda da eficiência do processo.³⁷⁻³⁹

O tempo de extração é otimizado considerando o equilíbrio de sorção. O equilíbrio de sorção será atingido quando não houver aumento na quantidade de massa extraída, com o aumento do tempo de extração. Este é dependente do processo de agitação, assim como da constante de distribuição do analito entre a fase extratora PDMS e a amostra.³⁷⁻³⁹

1.4.3.2.2 pH da matriz biológica

O pH da amostra é importante para a extração de analitos que possuem grupos dissociáveis, dependentes do pH do meio. Somente as formas não-dissociadas dos analitos são extraídas pela fase extratora PDMS.

O pH da amostra tem sido ajustado com uma solução tampão, onde a maioria dos analitos dissociados passará à forma não-dissociada, favorecendo o processo de extração. Em uma mistura tamponada, o processo SBSE apresenta maior eficiência de extração e linearidade quando comparada a uma mistura não tamponada, pois a razão entre as formas não-dissociadas e dissociadas permanece constante.³⁷⁻³⁹

Os analitos básicos, como os antidepressivos, têm sido analisados em pH básico e analitos ácidos, como os clorofenóis, têm sido extraídos em pH ácido.³⁷⁻³⁹

1.4.3.2.3 Otimização do processo de dessorção

Durante a dessorção os analitos difundem-se da fase extratora para o fluido de arraste. Portanto, as variáveis como tempo e temperatura de dessorção deverão ser otimizadas para eliminar o efeito memória.³³

1.4.3.3 Aplicações do método SBSE

A extração sortiva em barra de agitação tem sido aplicada com êxito na análise de diferentes compostos em matrizes biológicas, tais como: urina, plasma, sangue, saliva e soro.³⁴

Queiroz *et al.*⁴⁰ padronizaram e validaram um método para análise de antidepressivos não tricíclicos em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica. O limite de quantificação do método SBSE variou de 10 a 40 ng mL⁻¹ com coeficiente de variação inferior a 15 % e valores de recuperação superiores a 80%.

Lanças *et al.*⁴¹ analisaram fluoxetina e desipramina (padrão interno) em amostras de plasma por LC-MS. O método desenvolvido apresentou sensibilidade analítica adequada quando comparado com a extração em fase sólida. Os coeficientes de variação foram 4,7% e 5,0%, respectivamente.

As amostras de urina têm sido extraídas diretamente ou após hidrólise enzimática. Amostras de sangue, fluido de bile e esperma devem ser diluídas com a água ou uma solução tampão antes do processo de extração.⁴²

Nakazawa *et al.*⁴³ analisaram compostos fenólicos, 4-nonilfenol e 4-*ter*-octilfenol, em amostras de plasma ou urina com uma barra SBSE de 24 µL de

PDMS, por cromatografia gasosa com espectrometria de massas (GC-MS). O estudo revelou a presença dos analitos nas amostras de plasma nas concentrações de 0,2 e 0,3 ng mL⁻¹, respectivamente, porém não foram encontradas presentes nas amostras de urina, pois estas substâncias são metabolizadas no fígado e excretadas na forma de glucoronídeos.

Nakazawa *et al*⁴⁴ desenvolveram um método para análise de traços de 2,2-bis(4-hidroxifenol)propano em amostras de plasma, urina e saliva, utilizando derivatização *in situ* e análises por GC-MS. Os valores de limite de detecção encontrados foram de 20, 100 e 20 pg mL⁻¹, respectivamente.

Uma importante classe de compostos analisados tem sido os hormônios estereóides, com o intuito de monitorar a ação e funcionamento das glândulas endócrinas, pois estas podem estar associadas com várias doenças como câncer de mama e anorexia nervosa.

Almeida *et al*⁴⁵, utilizaram uma barra SBSE revestida com 126 µL de PDMS na análise de seis hormônios estereóides em amostras de urina. As concentrações encontradas nas amostras de urina foram inferiores a 10 µg L⁻¹, estes níveis de concentração são aceitáveis para o corpo humano.

A testosterona e epitestosterona foram analisadas em amostra de urina de pacientes HIV positivos através da técnica TD/GC-MS. Segundo os autores, os pacientes HIV positivos apresentam menor excreção destes hormônios. A análise dos hormônios foi realizada por derivatização com ácido acético anidro, durante 30 minutos a 90°C. O método desenvolvido apresentou limite de detecção 0,3 e 0,9 ng mL⁻¹, respectivamente.⁴⁶

A análise de ácido tubérculo em escarro demonstra a aplicabilidade da técnica SBSE para análises de rotina. As análises foram realizadas em menor

tempo (60 minutos) com precisão e exatidão equivalentes ao método padrão de diagnóstico convencional, o qual requer 8 semanas para obtenção do resultado.⁴⁷

A aplicação da técnica SBSE se estende ainda para áreas ambientais e alimentícias, como pode ser observado nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Aplicação SBSE em amostras ambientais.

ANALITO	MATRIZ	PROCESSO DE EXTRAÇÃO	DETECÇÃO	LIMITE DE DETECÇÃO	OBS.
Difeniléteres ⁴⁸	Água	240 min, 1250 rpm	¹ GC-MS	0.3 a 203,4 ng L ⁻¹	² DL sob banho de ultrasom, em 15 minutos.
Pesticidas ⁴⁹	Água de rio	60 min, 750 rpm	GC-MS	1.0 a 2.5 ng L ⁻¹	DL em ACN, sob banho de ultrasom, 15 min.
Pesticidas ⁵⁰	Água de rio	60 min, 100 rpm	GC-MS	0.2 a 2,5 ng L ⁻¹	³ DT Adição de 30 % de NaCl.
Fenóis ⁵¹	Água	120 min, 60 min	GC-MS	0.1 a 0.4 ng mL ⁻¹	DT
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos ⁵²	Água	80 min, 1000 rpm	⁴ LC-ED	0.2 a 2,0 ng L ⁻¹	DL
Xenoestrogenos fenólicos ⁵³	Água	180 min	GC-MS	0,5 a 2,0 pg mL ⁻¹	Derivatização com ácido anidrido acético
Clorofenóis ⁵⁴	Água	120 min	GC-MS	1,0 a 2,0 ng L ⁻¹	Derivatização com ácido anidrido acético
Estradiol ⁵⁵	Água	120 min	GC-MS	0,5 ng L ⁻¹	Derivatização com ácido anidrido acético e ⁵ BSTFA.
Fitalatos ⁵⁶	Água	60 min, 750 rpm	SGC-MS	3,0 a 40,0 ng L ⁻¹	DL Banho de ultrasom, 15 min.
Pesticidas ⁵⁷	Solo	180 min	GC-MS	0,002 a 5,0 ng g ⁻¹	A extração foi realizada sob controle de pressão.

¹GC-MS: cromatografia gasosa, ²DL: dessorção líquida, ³DT: dessorção térmica, ⁴LC-ED: cromatografia líquida com detector de fluorescência, ⁵BSTFA: N, O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida.

Tabela 2: Aplicação SBSE em amostras de alimentos.

ANALITO	MATRIZ	CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO	DETECÇÃO	LIMITE DE DETECÇÃO	OBS.
Aldeídos ⁵⁸	Vinho	90 min, 700 rpm	GC-MS	0.61 e 0.69 ng L ⁻¹	¹ DT
Pesticidas ⁵⁹	Água	600 rpm 30 min	GC-TDS	≤ 0.15 ng g ⁻¹	DT
Pesticidas ⁶⁰	Laranja	1250 rpm, 30 min	GC- FID	0.17 a 0.05g mL ⁻¹	Incorporação de sol – gel entrecruzado com o revetimento de PDMS.
Fenóis ⁶¹	Vinho	60 min, 900 rpm	GC–MS	0,006 a 0,159 mg L ⁻¹	DT
² COVs ⁶²	Bebidas	30 ou 60 min, 800 rpm	GC–MS	-	DT A barra SBSE foi lavada em água a 60 °C para remoção de açúcares.
COVs ⁶³	Vinagre	120 min, 1250 rpm	GC–MS	0,03 a 8,60 g L ⁻¹	DT
Metabólitos voláteis de fungos ⁶⁴	Fungos	30 min	GC–MS	-	DT Foi realizada extração em headspace.
Fungicidas ⁶⁵	Vinhos	40 min, 1440 rpm	GC–MS	0.2 e 2,0 mg L ⁻¹	DT

¹DT: dessorção térmica, ² COVs: compostos orgânicos voláteis.

1.4.3.4 Desenvolvimento de novas fases extratoras para SBSE

A fase extratora PDMS é a única disponível atualmente no mercado, o que tem limitado a sensibilidade e a seletividade analítica da técnica SBSE. A extração de analitos por SBSE utilizando a fase extratora de PDMS é limitada para compostos com alto coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow} > 2,7$), frequentemente, processos de derivatização têm sido utilizados para análise de analitos polares⁶⁶.

Recentemente, outras fases extratoras têm sido desenvolvidas com o objetivo de aumentar a seletividade da técnica SBSE.

Bicchi *et al.*⁶⁷ desenvolveram uma barra SBSE mista, os autores utilizaram um tubo de PDMS empacotado com carbono ativado, cujas extremidades foram fechadas com material magnético para promover a agitação.

A combinação destas duas fases resultou em diferentes mecanismos de extração, absorção através do revestimento PDMS e adsorção pelo revestimento de carbono. A fase extratora mista foi avaliada para análises de compostos voláteis e/ou polares em amostras de café, folhas de sálvia e uísque. O método padronizado apresentou coeficiente de variação inferior a 16,9% e taxas de recuperação próximas a 80%, as quais foram superiores aos valores encontrados com as barras SBSE comerciais.

Liu *et al.*⁶⁸ prepararam um revestimento de PDMS sol-gel, entrecruzado parcialmente, para extração de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e pesticidas organofosforados em água. Devido a maior adesão do revestimento de PDMS sol-gel a superfície de sílica fundida da barra SBSE, a fase extratora

mostrou menor sangria, maior repetitividade e maior tempo de uso. O método padronizado apresentou limites de detecção de 0,18-20 pg mL⁻¹.

Lambert *et al.*⁶⁶ desenvolveram uma barra SBSE revestida com alquidiol sílica (ADS), material de acesso restrito (RAM), para solucionar o problema das interferências das proteínas presentes nos fluidos biológicos.

As partículas ADS (Figura 15) possuem superfície exterior hidrofílica e eletricamente-neutra (diol) dificultando a adsorção das proteínas e a superfície interna (fase ligada, alquil hidrofóbica, C₁₈) responsável pela extração dos analitos. Dessa forma, as partículas ADS são capazes de fracionar a amostra em matriz protéica e analito, através do controle do tamanho de seus poros, os quais formam uma barreira excluindo as macromoléculas.

Simultaneamente ao processo de exclusão pelo tamanho, compostos com moléculas de baixa massa molar são extraídos e enriquecidos, via partição, na fase interior (C₁₈). A SBSE-RAM foi utilizada nas análises de cafeína e seus metabólitos em fluidos biológicos, resultando em limite de detecção de 25 ng mL⁻¹.

Figura 15: Partículas ADS.⁶⁹

Estas novas fases extratoras mostraram-se mais eficientes e/ou mais seletivas quando comparadas à fase SBSE de PDMS (comercial).

1.4.4 Polipirrol (PPY) como fase extratora

O uso de polipirrol (Figura 16) como fase extratora está relacionado às diferentes interações de seus grupos funcionais (hidrofóbica, π - π , com o grupo funcional polar, troca iônica, ácido-básica, dipolo-dipolo e dipolo induzido-dipolo.) com os analitos.

O polipirrol tem-se mostrado estável em fases móveis utilizadas em cromatografia líquida e em soluções de diferentes valores de pH (1,5 a 10,0), permitindo a utilização de solução tampão em pH adequado, segundo o equilíbrio ácido-base dos analitos em solução.⁷⁰

Figura 16: Cadeia polimérica de Polipirrol.

Pawliszyn *et al*⁷⁰ revestiram a superfície interna de um capilar de sílica fundida com polipirrol e poli-*N*-fenilpirrol para análises “in tube” SPME. A morfologia da superfície do revestimento polimérico do capilar de sílica foi

avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura, as quais revelaram a presença de estruturas porosas.

A presença de poros propicia um aumento da área ativa da superfície extratora, o que resultou em maior seletividade e sensibilidade analítica para análise de compostos polares, aromáticos, básicos e aniônicos em relação às fases extratoras comerciais.

Na literatura são encontrados alguns trabalhos utilizando PPY como fase extratora para análises de fármacos em fluidos biológicos, e pesticidas em amostras ambientais através das técnicas SPME “in tube” /LC-MS ou SPME/GC-MS ⁷¹⁻⁷⁵, porém o polipirrol ainda não foi avaliado como fase extratora para SBSE.

1.4.5 Mecanismos de extração

A adsorção e absorção têm sido os principais mecanismos de interação do analito com a fase extratora polimérica. O mecanismo de adsorção é um processo característico de revestimentos porosos como polipirrol.

Segundo a teoria baseada nas isotermas de adsorção de Langmuir, o número de sítios ativos na superfície da fase extratora é limitado, portanto, quando todos os sítios estiverem ocupados, iniciará o processo de competição entre os analitos pelos sítios ativos na superfície. Os analitos de maior afinidade pela fase extratora irão deslocar os de menor afinidade, ou seja, analitos com menor coeficiente de sorção. ⁷⁶

Para filmes líquidos como PDMS, um polímero homogêneo, o mecanismo de extração ocorre por absorção. Este processo é não competitivo

(em comparação com o de adsorção) onde cada analito tem seu coeficiente de partição com a fase extratora. A interação do analito na superfície é mais fraca em relação ao processo de adsorção e a degradação de analitos instáveis é significativamente menor.⁷⁶

Cho *et al.*⁷⁷ estudaram o mecanismo de extração na superfície polimérica das fibras SPME, Carboxen-PDMS e PDMS, para análises de compostos orgânicos em amostras ambientais. Os autores observaram o processo de competição (adsorção) para a fibra mista Carboxen-PDMS, enquanto para a fibra de PDMS foi observado o processo de absorção, pois as análises SPME (PDMS) apresentaram ampla faixa linear, ou seja, correlação linear entre as concentrações de analito extraído e a concentração inicial de analito na amostra.

Tuduri *et al.*⁷⁸ analisaram traços de compostos orgânicos voláteis em amostras de ar, utilizando cinco diferentes fibras SPME (PDMS, PDMS-DVB, CWAX-DVB, PDMS-CAR e PDMS-DVB-CAR). Os autores observaram um menor tempo de equilíbrio de extração (5 minutos) para o revestimento de PDMS (processo de absorção) em comparação com as demais fibras (20 a 150 minutos), onde predominou o processo de adsorção.

A Figura 17 ilustra os estágios inicial e final dos processos de extração por absorção e adsorção.

Figura 17: Mecanismo de extração: absorção e adsorção. ⁷⁶

1.5 CROMATOGRAPHIA LÍQUIDA EM FASE REVERSA ^{79,80}

A cromatografia em fase reversa é a modalidade da cromatografia líquida mais utilizada, cerca de 75% das análises empregam esta técnica. Esta modalidade da cromatografia líquida apresenta várias vantagens, tais como, o uso de fases móveis menos tóxicas e de menor custo, como metanol e água, fases estacionárias estáveis com diferentes grupos químicos ligados à sílica,

equilíbrio rápido da coluna, após a mudança da fase móvel, maior rapidez das análises em decorrência do pequeno diâmetro das partículas que recheiam a coluna e repetitividade dos tempos de retenção. No entanto, a fase móvel deverá apresentar intervalo de pH de 2 a 8, para evitar hidrólise dos grupos silanóis em pH ácido e sangria da fase estacionária em pH maior que 8.

As separações cromatográficas são realizadas em fase estacionária apolar quimicamente ligada aos grupos silanóis da superfície da sílica, processo reverso à cromatografia líquida em fase normal.

Os mecanismos de partição e/ou adsorção e a teoria solvofóbica têm sido utilizados para explicar as interações dos analitos com a fase estacionária.

O processo de partição, ou equilíbrio de partição do analito entre as fases: móvel e fino filme de fase líquida apolar revestindo o suporte sólido, a sílica, tem sido observado. O processo de partição baseia-se na solubilidade do analito entre as fases. A seletividade/especificidade da retenção do analito poderá ser mudada variando o grupo apolar quimicamente ligado à superfície da sílica. Várias colunas, em fase reversa, encontram-se disponíveis no mercado.

As fases estacionárias, quimicamente ligadas, devido às ligações covalentes são bem estáveis, possibilitando o uso de maiores valores de vazão e temperatura, assim como o emprego da eluição por gradiente. No entanto, apenas 50% ou menos dos grupos silanóis participam da reação de sililação. Desta forma, retenções indesejáveis, principalmente com analitos polares, podem ser observadas com os grupos silanóis residuais, tais como, adsorção reversível, resultando em cromatogramas com picos largos e assimétricos, ou irreversíveis com conseqüente deterioração da coluna.

Alguns autores definem a fase estacionária quimicamente ligada, como um sólido sorvente modificado. Em razão da superfície heterogênea da sílica, com diferentes grupos silanóis, nos quais, as concentrações e acidez variam, diferentes interações podem ser observadas em diferentes regiões da superfície da sílica.

A composição da fase móvel também influencia no mecanismo de retenção. Quando a fase móvel aquosa apresenta baixa concentração de solvente orgânico, a teoria solvofóbica tem sido considerada a mais apropriada, para explicar o mecanismo de retenção em fase reversa. A retenção do analito não ocorre em decorrência de interações específicas com a fase estacionária, mas em razão das interações solvofóbicas com a fase móvel. Neste caso, a composição da fase móvel apresenta maior influência na seletividade da separação, quando comparada à fase estacionária.

A eficiência de uma coluna em fase reversa tem sido determinada por quatro fatores: o pré-tratamento da sílica; o grupo apolar quimicamente ligado à superfície da sílica; a densidade de fase estacionária (cadeia alquila) ligada à superfície da sílica e as reações secundárias, como o capeamento.

As características das partículas de sílica, tais como: tamanho do poro, tamanho da partícula, forma, e área superficial, assim como o seu pré-tratamento, incluindo adição de água ou ácido, e temperatura de aquecimento, influenciam a reatividade, e conseqüentemente a eficiência da fase quimicamente ligada. Em RPLC, a força das interações junto à fase estacionária apolar, particularmente para misturas contendo compostos polares ou básicos, depende da reatividade da sílica usada como suporte. Por exemplo, a retenção de compostos fortemente básicos varia com a acidez dos

grupos silanóis, presentes na superfície da sílica. Quando os silanóis forem fortemente ácidos, a retenção será maior e os picos dos compostos básicos serão largos e com caudas.

1.5.1 Fases estacionárias quimicamente ligadas

As fases estacionárias quimicamente ligadas podem ser obtidas através de diversas reações químicas a partir da sílica ou outros suportes. A reação mais utilizada é a formação da ligação siloxano por reação do grupo silanol com um agente sililante, como organoclorossilano. Nestas reações, primeiramente, faz-se necessário ativar os grupos hidroxilas da superfície da sílica através de aquecimento, removendo as moléculas de água ligadas à sua superfície. Em seguida, promove-se a reação entre um organossilano e os grupos hidroxilas superficiais.^{79,80}

Dependendo da escolha do agente sililante e das condições de reação, podem obter sílicas modificadas com a mesma composição química, porém com propriedades cromatográficas diferentes, principalmente na retenção dos compostos e na seletividade, denominadas de fases monoméricas e poliméricas (Figura 18).^{79,80}

diminuindo significativamente sua retenção nas fases estacionárias reversas. Os ácidos perdem um próton e tornam-se ionizados à medida que o pH aumenta; as bases ganham um próton e tornam-se ionizadas à medida que o pH diminui. Portanto, à medida que o pH aumenta, a retenção de compostos básicos aumenta e a retenção de compostos ácidos diminui. Usa-se o controle do pH da fase móvel para promover a separação de solutos iônicos, onde a retenção será maior quando o composto estiver na sua forma não iônica.^{79,80}

1.5.3 DETECTORES DE ULTRAVIOLETA

Os detectores mais freqüentemente utilizados em cromatografia líquida de alta eficiência são os espectrofotométricos. Estes detectores consistem de uma célula de fluxo localizada no término da coluna cromatográfica. A radiação ultravioleta passa, constantemente, pela célula de fluxo e é recebida pelo sensor (Figura 19).

Figura 19: Célula do detector de ultravioleta.

Detectores de comprimento de onda fixo (Figura 20) operam em um único comprimento de onda, geralmente 254 nm, emitido por uma lâmpada de mercúrio de baixa pressão. Os detectores de comprimentos de onda variável UV-VIS, cobrindo a faixa de 190-800 nm, através de monocromador que seleciona o comprimento de onda desejado do feixe de luz emitido pelas lâmpadas de deutério (UV) ou tungstênio (VIS), oferecem várias vantagens sobre os instrumentos de comprimento de onda fixo:

a) Apresenta alta absorbância para vários componentes devido à escolha de comprimento de onda e, conseqüentemente, tem maior sensibilidade.

b) Promove eficiência em eluição por gradiente através da habilidade de selecionar um comprimento de onda onde os componentes da fase móvel não apresentam uma variação de absorbância para diferentes concentrações.

c) Permite obter o espectro de absorbância de cada componente em separado após parar a vazão da fase móvel.

Figura 20: Detector de UV de comprimento de onda variável. ⁸¹

Análises em diferentes comprimentos de onda também são possíveis com os detectores espectrofotométricos através de um arranjo de fotodiodos. Esses fotodiodos, seletivos a determinados comprimentos de onda, em grande número, cerca de 250, permitem obter o espectro da substância durante a eluição (Figura 21).

Figura 21: Esquema de um detector de rede de diodos.⁸¹

1.6 Validação analítica^{82,83}

Segundo as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, exatidão, linearidade, precisão, limite de quantificação, limite de detecção e recuperação adequadas à análise.

1.6.1 Especificidade/Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Em geral uma forma simples de verificar a seletividade de um método é observar a presença de picos na região do tempo de retenção de interesse injetando-se um branco obtido com a mesma matriz a ser analisada.

1.6.2 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 (cinco) concentrações diferentes.

A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica.

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular, a partir dos pontos

experimentais, o coeficiente de correlação r . Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Pela ANVISA o coeficiente de determinação ou regressão (r^2) deve ser maior ou igual a 0,99.

1.6.3 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão pode, também, ser expressa como precisão intra-ensaios, quando medida em um mesmo dia e inter ensaios quando medida ao longo de vários dias.

Esse parâmetro deve ser avaliado em três níveis de concentração (baixo, médio e alto), realizando-se no mínimo 5 (cinco) determinações em cada concentração. A precisão é avaliada pelo cálculo do desvio padrão (RSD) ou coeficiente de variação (CV%), e segundo a ANVISA em se tratando de amostras biológicas deve apresentar coeficientes de variação superiores a 15%, exceto no limite de quantificação, para o qual se admite valores até 20%.

1.6.4 Exatidão

A exatidão do método deve ser determinada utilizando-se, no mínimo, 3 (três) concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se, no mínimo, 5 (cinco) determinações por

concentração. Sendo expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

De acordo com a ANVISA deve apresentar valores entre 80 a 120 % (oitenta a cento e vinte por cento), através da análise de, no mínimo, 5 (cinco) amostras de padrões.

1.6.5 Limite de quantificação (LQ)

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Também pode ser determinado por meio do ruído. Neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído igual ou superior a 10:1 com coeficiente de variação inferior a 20%.

1.6.6 Limite de detecção (LD)

É a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável; a estimativa do limite de detecção pode ser feito com base na relação de três vezes o ruído da linha de base.

1.6.7 Recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, porém, admitem-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exatos.

A recuperação relativa representa a razão entre o quociente das áreas, do analito e do padrão interno extraídos de uma amostra enriquecida, e o quociente das áreas dos mesmos quando não submetidos ao processo de extração.

A recuperação absoluta é uma relação entre a resposta do analito extraído da matriz fortificada e a resposta do padrão analítico puro que não tenha sido submetido ao processo de extração. A recuperação gerada pelo analito não extraído representa uma recuperação de 100%.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- O desenvolvimento da barra de extração sortiva (SBSE) com revestimento de PDMS/PPY;
- Otimização das variáveis do método SBSE para análise simultânea dos antidepressivos (mirtazapina, citalopram, paroxetina, duloxetina, fluoxetina, sertralina) em amostras de plasma, para fins de monitorização terapêutica;
- Otimização das condições cromatográficas LC-UV;
- Validação analítica do método SBSE/LC-UV, segundo normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA);
- Análise das amostras de plasma de pacientes em terapia com os antidepressivos em estudo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Padrões analíticos e reagentes

Os padrões primários dos antidepressivos: fluoxetina e paroxetina foram gentilmente doados pelos laboratórios, Lilly (São Paulo, Brasil) e Libbs (São Paulo, Brasil), respectivamente. Citalopram, mirtazapina, sertralina, foram doados pela Roche (São Paulo, Brasil) e clomipramina (padrão interno) pela Pfizer (São Paulo, Brasil). O Polidimetilsiloxano foi adquirido do fornecedor Dow Corning Corporation (Midland, EUA), e o pirrol da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

As soluções padrão diluídas dos antidepressivos foram preparadas em metanol considerando o intervalo terapêutico, a partir da diluição de suas respectivas soluções estoques de 1mg/mL em metanol. Estas soluções apresentaram estabilidade de 45 dias, quando permanecidas a -20°C.

O metanol e a acetonitrila, ambos grau cromatográfico, foram adquiridos do fornecedor J.T. Baker (Phillipsburg USA); ácido clorídrico, fosfato de potássico monobásico e dibásico, borato de sódio, acetato de sódio e ácido acético da Mallinckrodt Baker (Xalostoc, México). A água utilizada nos ensaios foi purificada pelo sistema Milli-Q, Millipore (São Paulo, Brasil).

3.2 Otimização das condições cromatográficas LC-UV

As análises dos antidepressivos foram realizadas por cromatografia líquida em fase reversa (C₁₈).

Para a obtenção de satisfatória resolução cromatográfica dos fármacos, em menor tempo de análise, diferentes composições de fases móveis foram avaliadas (Tabela 3).

Tabela 3: Composição das fases móveis avaliadas.

Fases	Tampão acetato	Acetonitrila	Metanol
0,25 mol L⁻¹ pH 4,5			
1	60 %	37%	3%
2	55%	40%	5%
3	52%	43%	5%
4	50%	47%	3%
Fases	Tampão fosfato	Acetonitrila	
0,05 mol L⁻¹ pH 3,8			
5	50%	50%	-
6	53%	47%	-

Após a otimização da composição da fase móvel, as análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido da *Varian*, modelo

Prostar 230, equipado com detector Ultravioleta (*Varian*, modelo Prostar 310) e detector de arranjo de fotodiodos (*Varian*, modelo Prostar 330), comprimento de onda selecionado em $\lambda = 230$ nm.

Os fármacos foram separados em coluna Lichrospher® 60 RP-Select B (5 μ m, 250 x 4 mm) (Merk - Darmstadt, Alemanha), e pré-coluna RP-Select B (Merk - Darmstadt, Alemanha), LiChroCART® 4-4.

A fase móvel selecionada para análise dos antidepressivos foi: solução tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH = 3,8 e acetonitrila (53:47 v/v), com fluxo de 1 mL/min, no modo isocrático. O volume de amostra injetado foi de 50 μ L.

3.3 Desenvolvimento da barra SBSE com revestimento de PDMS/PPY

A barra de extração sortiva PDMS/PPY (Figura 22) foi desenvolvida em parceria com o Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças, Laboratório de Cromatografia do Instituto de Química de São Carlos, USP.

Para o preparo da barra, uma mistura de PDMS com agente de cura na proporção 10:1 (m/m), respectivamente, e 10% (m/m) de polipirrol foi colocada em um molde, desenvolvido para o preparo da barra, contendo em seu interior, um tubo de aço inoxidável (2,5 cm), o qual foi revestido com o polímero, sob vácuo para retirar as bolhas formadas.

O molde foi aquecido em forno nas seguintes condições: temperatura inicial 60°C, durante 1 hora, rampa de aquecimento de 10°C/minuto até 220°C, mantendo nesta temperatura por 2 horas. O volume total de revestimento foi de 22 μ L.

Figura 22: Barra SBSE revestida com PDMS/PPY.

3.4 Amostras de plasma

As amostras de plasma, branco de referência, livres de antidepressivos, sorologia negativa para hepatite B e C, chagas, HIV, HTLV-I/II, TGP e sífilis foram cedidas pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto-USP.

Estas amostras foram enriquecidas com soluções padrão dos antidepressivos em diferentes concentrações e com o padrão interno (clomipramina, 50 μL , 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), as quais resultaram em concentrações plasmáticas que incluem os intervalos terapêuticos. Estas amostras de plasma foram utilizadas na validação analítica do método SBSE-LC/UV.

As amostras de plasma de pacientes foram coletadas de indivíduos em terapia com os antidepressivos, durante o período mínimo de duas semanas, e após 12 horas após da última administração do medicamento.

Estas amostras foram gentilmente doadas pela Prof. Dr. Regina Helena Costa Queiroz da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. A coleta destas amostras de plasma foi realizada segundo os critérios estabelecidos pelo Comitê de ética da Universidade de São Paulo.

As amostras de pacientes que fazem uso dos antidepressivos foram coletadas pela manhã, com os pacientes em jejum, antes do horário da próxima medicação. Estas amostras foram enriquecidas com o padrão interno (clomipramina, 50 μL , 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e utilizadas para avaliação da metodologia SBSE-LC/UV padronizada.

3.5 Otimização das variáveis SBSE para análise dos antidepressivos

As variáveis do processo SBSE, tais como: tempo e temperatura de extração, pH e processo de dessorção foram otimizadas para a obtenção de eficiente extração em menor tempo de análise.

O primeiro passo foi avaliar a influência do pH da amostra. Foram avaliados três diferentes valores de pH da amostra: 9,0, 7,0, e 5,0. Em um frasco pyrex (5 mL) com tampa de rosca e septo de silicone, e adicionado 1 mL de amostra, enriquecida com solução de padrão interno (clomipramina, 50 μL , 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e dos antidepressivos, resultando na concentração plasmática de 500 ng mL^{-1} . Para ajuste do pH, a amostra foi diluída com 3 mL de solução tampão.

A barra de agitação magnética SBSE foi inserida no frasco e o processo de extração foi realizado sob aquecimento e agitação magnética constante

durante 40 min. As variáveis, tempo de extração (20, 30, 40 e 50 min) e temperatura (25, 40, 60 e 70°C) de extração foram também otimizadas, simultaneamente, para cada fármaco.

Após a extração a barra SBSE foi retirada do frasco de extração e seca com papel. Em seguida, para o processo de dessorção dos fármacos, a barra SBSE foi inserida em um frasco de vidro pyrex cônico com tampa de rosca, contendo 200 μL de fase móvel, e colocada em banho de ultra-som.

Diferentes tempos de dessorção foram avaliados (5, 10, 15, 20, 25, 30 min) à temperatura ambiente (25°C). Após o processo de dessorção SBSE, uma alíquota de 50 μL da solução foi injetada no cromatógrafo líquido.

Entre as extrações, a barra PDMS/PPY foi submetida a um processo de limpeza, com água Milli-Q e metanol (70:30 v/v) por 20 min, à temperatura de 40°C, sob agitação magnética.

3.6 Estudo do mecanismo adsorção/absorção de extração

Para avaliação dos mecanismos de extração dos fármacos com a barra de PDMS/PPY, análises individuais de amostras de plasma enriquecidas com os antidepressivos, citalopram ou duloxetina na concentração plasmática de 500 ng mL^{-1} , foram realizadas em réplicas ($n = 3$), com diferentes tempos de extração (30, 40 e 50 min).

Os resultados obtidos, ou seja, análises quantitativas individuais de citalopram e duloxetina, foram comparados com aqueles obtidos nas análises de amostras de plasma enriquecidas com todos os antidepressivos (mirtazapina, citalopram, paroxetina, duloxetina, fluoxetina e sertralina) na

concentração plasmática de 500 ng mL⁻¹ nas mesmas condições de extração, em réplicas (n = 3).

Este procedimento, análise individual e simultânea dos fármacos, foi também realizado com a barra de PDMS desenvolvida no laboratório, segundo o procedimento descrito no item 3.3. No entanto, somente o polímero PDMS foi utilizado para o preparo da barra.

3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As morfologias das superfícies das barras de PDMS/PPY e PDMS desenvolvidas foram avaliadas e comparadas por Microscopia Eletrônica de Varredura.

As barra de PDMS/PPY e PDMS foram cortadas e 1 cm destas, foram recobertas com uma camada de ouro e analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura (Zeiss EVO50) do Departamento de Química, FFCLRP da Universidade de São Paulo. As medidas foram feitas sob tensão de 20.00KV, magnitude 30.00 KX e resolução nominal de 2 µm.

3.8 Validação analítica

Para a validação analítica do método SBSE/LC-UV padronizado, amostras de plasma (branco de referência) foram enriquecidas com soluções padrão dos antidepressivos, que resultaram em concentrações plasmáticas que contemplam o intervalo terapêutico.

Segundo as normas da ANVISA foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade/seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção e recuperação relativa e absoluta.

3.8.1 Especificidade/ seletividade

Para determinar a especificidade do método SBSE, amostras de plasma branco de referência foram enriquecidas com a solução do padrão interno (clomipramina, 50 μL , 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e solução dos antidepressivos, que resultaram em concentração plasmática de 500 ng mL^{-1} ; estas foram diluídas com 3 mL de solução tampão pH = 9,0.

O processo de extração foi realizado em temperatura de 40°C, durante 40 minutos, sob agitação magnética constante. Em seguida, o processo de dessorção foi realizado em 200 μL de fase móvel sob banho de ultra som, durante 15 minutos, a temperatura de 25 °C.

Após a dessorção dos analitos, uma alíquota de 50 μL foi injetada no cromatógrafo líquido e analisadas em fluxo de 1 mL por minuto, fase móvel tampão fosfato pH 3,8 0,05 mol L^{-1} e acetonitrila (53:47 v/v), comprimento de onda selecionado 256 nm.

Para a obtenção do cromatograma da amostra de plasma branco de referência, livre dos antidepressivos, 1 mL de amostras de plasma foi diluído com 3 mL de solução tampão pH = 9,0, em seguida submetido ao processo de extração SBSE e as análises descritas no parágrafo anterior.

Os cromatogramas de amostras de plasma enriquecido com os analitos e amostras de plasma branco de referência foram comparados para verificar os

tempos de retenção dos analitos e dos compostos endógenos da matriz biológica.

Outros fármacos, tais como: cafeína, moclobemida, diazepam, carbamazepina, nortriptilina, imipramina e amitriptilina que os pacientes depressivos podem administrar concomitantemente com os antidepressivos em estudo foram também avaliados. As soluções padrões dos fármacos na concentração de 500 ng mL^{-1} foram analisados nas mesmas condições cromatográficas estabelecidas para os antidepressivos em estudo.

Os tempos de retenção dos fármacos foram comparados com os tempos de retenção dos analitos.

3.8.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada segundo as normas da ANVISA, a qual preconiza que esta seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes.

O procedimento foi realizado com amostras de plasma branco de referência enriquecidas com a solução do padrão interno (clomipramina, $50 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) e solução padrão dos antidepressivos nas concentrações que variaram do limite de quantificação a 500 ng mL^{-1} e submetidas ao processo de extração SBSE de acordo com metodologia citada no item 3.5, sendo que cada concentração foi avaliada em replicatas ($n = 5$).

As curvas analíticas ou de calibração foram traçadas com os valores médios das razões entre as áreas dos analitos extraídos e as áreas do padrão interno (eixo y) e no eixo x as concentrações plasmáticas correspondentes.

3.8.3 Precisão interensaio

A precisão foi realizada em dias diferentes, com amostras de plasma branco de referência enriquecidas com a solução padrão dos antidepressivos nas concentrações 100, 300 e 500 ng mL⁻¹ em replicatas (n = 5) com adição do padrão interno (clomipramina, 50 µL, 10 µg mL⁻¹), e submetidas ao processo de extração SBSE de acordo com metodologia citada no item 3.5.

A precisão foi avaliada pelo coeficiente de variação (CV%) calculada a partir do desvio padrão absoluto e pelas médias das áreas das concentrações obtidas.

3.8.4 Exatidão

A exatidão do método foi verificada a partir de, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo terapêutico, ou seja, três concentrações, 100, 300 e 500 ng mL⁻¹, com três réplicas cada, e analisadas segundo os itens 3.5 e 3.2. Os valores de exatidão foram determinados pela razão entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

3.8.5 Limite de quantificação

Os limites de quantificação foram determinados através das extrações de amostras de plasma enriquecidas com soluções padrão dos

antidepressivos, em concentrações decrescentes, até a obtenção da razão sinal/ruído igual ou superior a 10, de acordo com as normas da ANVISA.

3.8.6 Limite de detecção

O limite de detecção foi avaliado com amostras de plasma enriquecidas com as soluções padrão dos antidepressivos em concentrações decrescentes até estabelecer uma razão sinal ruído igual ou superior a três vezes a linha de base.

3.8.7 Recuperação relativa

A recuperação foi avaliada a partir de duas concentrações, uma baixa (50 ng mL^{-1}) e uma alta (500 ng mL^{-1}) em replicatas ($n = 5$) com amostras de plasma enriquecidas com a solução do padrão interno (clomipramina, $50 \text{ }\mu\text{L}$, $10 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) e solução padrão dos antidepressivos e analisadas nas mesmas condições descritas nos itens 3.5 e 3.2.

O cálculo da recuperação foi realizado pela comparação entre as razões das áreas dos analitos extraídos (razão entre as médias das áreas do analito extraído e do padrão interno) e não extraídos (razão entre as médias das áreas do padrão analítico injetado sem passar pelo processo de extração e as médias das áreas do padrão interno também não extraído).

3.9 Comparação das metodologias SBSE utilizando as barras de PDMS e PDMS/PPY

A exatidão do método SBSE-PDMS/PPY foi também comprovada através da comparação deste, com o método SBSE/PDMS⁴⁰ utilizando a barra comercial de PDMS.

Os resultados quantitativos dos diferentes métodos, provenientes de amostras de plasma, enriquecidas com os analitos na faixa de concentração de 50 a 500 ng mL⁻¹, foram plotados em um gráfico. No eixo x, os valores de concentração referentes ao método SBSE/PDMS e no eixo y, os valores de concentração correspondentes ao método SBSE-PDMS/PPY.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise cromatográfica LC-UV/DAD

4.1.1 Otimização da fase móvel

Em razão da interação do analito com a fase móvel, a seleção se seus componentes são de extrema importância, para a obtenção de eficiente separação dos analitos em menor tempo de análise. A fase móvel não deverá apresentar leitura de absorvância, ou seja, deverá ser totalmente transparente no comprimento de onda selecionado para análise, caso o detector de ultravioleta seja utilizado.

Para otimização da fase móvel, na determinação simultânea dos antidepressivos (mirtazapina, citalopram, paroxetina, duloxetina, fluoxetina e sertralina) a fase móvel contendo solução tampão acetato ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 4,5), acetonitrila e metanol na proporção 60:37:3 (v/v/v) foi inicialmente avaliada. Nesta condição, os fármacos apresentaram longos tempos de retenção (Figura 23a), o que tornou inviável o tempo de análise. As proporções dos constituintes foram variadas, no entanto, não se obteve bons resultados.

Outra fase móvel contendo solução tampão fosfato (pH = 3,8, $0,05 \text{ mol L}^{-1}$) e acetonitrila, 50:50 (v/v), foi avaliada. Nesta condição, os fármacos apresentaram satisfatória resolução cromatográfica, em menor tempo de análise. Porém variando-se a proporção da solução tampão fosfato para 53% e acetonitrila para 47% foi observado decréscimo no tempo de análise e simetria dos picos (Figura 23b).

(a)

(b)

Figura 23: Cromatograma referente à análise da solução padrão dos antidepressivos, 1- mirtazapina, 2 - citalopram, 3 - paroxetina, 4 - duloxetina, 5 - fluoxetina, 6 - sertralina e 7 – clomipramina, (500 ng mL⁻¹). (a) fase móvel: solução tampão acetato (0,25 molL⁻¹, pH 4,5): acetonitrila:metanol (60:37:3, v/v/v); (b) fase móvel: solução tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH = 3,8 e acetonitrila (53:47 v/v) .

A ordem de eluição dos fármacos com seus respectivos tempos de retenção são ilustrados na Tabela 4, o cromatograma dos fármacos referente à análise da solução padrão dos antidepressivos (500 ng mL^{-1}) com a fase móvel selecionada é ilustrado na Figura 23b.

Tabela 4: Ordem de eluição dos fármacos e seus respectivos tempos de retenção, com a fase móvel selecionada.

Antidepressivos	Tempo de retenção (min)	pKa
Mirtazapina	4,3	7,1
Citalopram	5,4	9,5
Paroxetina	6,3	9,9
Duloxetina	7,3	9,3
Fluoxetina	8,7	8,7
Sertralina	9,5	9,5
Clomipramina	10,5	9,0

Os fármacos mais apolares apresentaram maior retenção na fase estacionária C_{18} . Segundo os valores de pKa dos analitos, na condição de análise, os analitos encontram-se ionizados não ocorrendo a supressão de ionização. Como a fase estacionária utilizada C_{18} select B é específica para análise de compostos básicos, o mecanismo de interação predominante é a partição.

A resolução cromatográfica mede a eficiência de separação entre dois picos adjacentes; uma resolução cromatográfica satisfatória deverá apresentar valores no intervalo de 1 a 1,5. De acordo com a Tabela 5, o cromatograma B apresentou uma melhor resolução cromatográfica em relação ao cromatograma A, ou seja, uma melhor separação entre os picos em menor tempo de análise.

O fator de retenção (k) mede a capacidade de retenção do analito pela fase estacionária, quanto mais retido for o composto pela fase estacionária maior será o valor de k . Valores de k entre 0,5 a 10 são desejáveis.

Nos resultados obtidos pelo cromatograma A, os valores de k variaram de 5,0 a 18, resultando em longo tempo de retenção dos fármacos e maior tempo de análise. Já no cromatograma B (Tabela 5) os valores de k variaram de 1,2 a 4,3, resultando em menor tempo de retenção dos fármacos e menor tempo de análise. Além disso, o cromatograma B apresentou sinal analítico mais intenso, e picos mais estreitos e simétricos, permitindo uma melhor integração das áreas.

Tabela 5: Cálculo do fator de retenção e resolução cromatográfica para os cromatogramas A e B.

Fármaco	Fator de retenção (k)		Resolução cromatográfica (R_s)	
	Cromatogramas		Cromatogramas	
	A	B	A	B
Mirtazapina	5,0	1,2	0,8	4,4
Citalopram	5,5	1,7		
Paroxetina	8,5	2,2		
Duloxetina	10,0	2,7		
Fluoxetina	13,0	3,4		
Sertralina	17,0	3,8		
Clomipramina	18,0	4,3		

Cromatograma A: fase móvel: solução tampão acetato ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5): acetonitrila:metanol (60:37:3, v/v/v).

Cromatograma B: fase móvel: solução tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 3,8 e acetonitrila (53:47 v/v).

4.1.2 Identificação e quantificação dos fármacos

A identificação dos fármacos nas amostras de plasma foi realizada pela comparação dos tempos de retenção dos antidepressivos obtidos, com os das soluções padrão dos mesmos, injetadas individualmente nas mesmas condições cromatográficas. Os espectros (absorbância versus comprimento de onda) na região do ultravioleta (UV) também foram considerados.

Para a quantificação, utilizou-se o método do padrão interno. A clomipramina (Figura 24) foi selecionada como padrão interno, pois atualmente, este antidepressivo tem sido pouco utilizado no tratamento da depressão, apresentou boa resolução cromatográfica, tem estrutura química similar aos antidepressivos em estudo, estável na fase móvel utilizada e pôde ser adicionada em concentrações similares aos dos analitos.

Este método é extremamente vantajoso, pois minimiza erros que poderiam ser gerados por variações da matriz biológica, nas variáveis experimentais ou mesmo na barra SBSE.⁸³

Figura 24: Estrutura química da clomipramina.

O comprimento de onda selecionado, $\lambda = 230$ nm, corresponde à região de absorção UV máxima para os fármacos analisados. Vários fármacos e compostos endógenos também apresentam absorção (UV) no λ selecionado. No entanto, no tempo de retenção dos analitos (t_r) não foram observados picos interferentes. No comprimento de onda selecionado a acetonitrila e o tampão

fosfato são transparentes. Os limites de absorbância no UV (nm) para a acetonitrila e tampão fosfato, são de 190 nm e menores que 200 nm, respectivamente.

4.2 Padronização do método SBSE/LC-UV para análise simultânea de antidepressivos

4.2.1 Otimização das variáveis SBSE

As variáveis tempo e temperatura de extração, pH da amostra e condições de dessorção, foram otimizadas para atingir o equilíbrio de sorção em menor tempo de análise.

A velocidade de agitação da barra magnética SBSE influencia no processo de difusão do analito da matriz para a fase extratora polimérica; uma alta velocidade de agitação pode aumentar a velocidade de transferência de massa para a fase extratora em menor tempo de extração.³³ A velocidade de agitação do agitador magnético foi mantida constante e em média velocidade.

A influência da variação do tempo de extração (20, 30, 40 e 50 min), em diferentes temperaturas (25, 40, 60, e 70°C) no processo SBSE, é ilustrada nas Figuras 25 a 31. Estas análises foram realizadas em triplicatas, para amostras aquosas enriquecidas com os antidepressivos. Os valores apresentados no gráfico são os valores médios com seus respectivos desvios.

Figura 25: Otimização do tempo e temperatura de extração para o antidepressivo mirtazapina.

Figura 26: Otimização do tempo e temperatura de extração para o antidepressivo citalopram.

Figura 27: Otimização do tempo e temperatura de extração para o antidepressivo paroxetina.

Figura 28: Otimização do tempo e temperatura de extração para o antidepressivo duloxetina.

Figura 29: Otimização do tempo e temperatura de extração para o antidepressivo fluoxetina.

Figura 30: Otimização do tempo e temperatura de extração para o antidepressivo sertralina.

Figura 31: Otimização do tempo e temperatura de extração para o antidepressivo clomipramina.

De acordo com os gráficos das Figuras de 25 a 31, observamos que o aumento da temperatura de extração SBSE de 25°C para 40°C resultou em maiores taxas de extração, pois o aumento da temperatura favoreceu a difusão dos analitos para a fase extratora. Com o aumento da temperatura acima de 40°C ocorreu perda da eficiência de extração, devido à diminuição do coeficiente de distribuição dos analitos entre a fase extratora e a amostra. O equilíbrio de sorção foi alcançado em 40 minutos para a maioria dos fármacos.

Quando se trabalha com fármacos que apresentam grupos ionizáveis, o pH da amostra deverá ser considerado na otimização do processo SBSE. O revestimento de polidimetilsioxano (PDMS) extrai somente analitos não iônicos³⁷⁻³⁹, no entanto, o revestimento de polipirrol é capaz de extrair compostos na sua forma iônica. O ajuste do pH da matriz biológica em valores,

nos quais, os fármacos encontram-se, na sua maior parte, na forma não dissociada, aumentará a eficiência de extração pelo revestimento de PDMS.

O efeito do pH da matriz biológica na eficiência de extração pode ser observado na Figura 32.

Segundo os resultados obtidos, o aumento no valor de pH, resultou em uma maior quantidade de fármaco extraído. Desta forma, as demais extrações foram realizadas com a diluição da amostra de plasma com solução tampão em pH 9,0. Este resultado está de acordo com o esperado pois, segundo os valores de pKa dos antidepressivos estudados (Tabela 4), neste valor de pH estes fármacos encontram parcialmente dissociados ou não dissociados, resultando em uma maior quantidade de fármaco extraído.

A diluição com solução tampão também diminui a viscosidade da matriz biológica, favorecendo o processo de difusão dos analitos para a fase extratora, pois diminui a interferência das proteínas no processo SBSE. Valores extremos de pH podem danificar o revestimento polimérico da barra de PDMS/PPY, portanto, com o intuito de preservar a barra SBSE, não foram avaliados valores de pH acima de 9,0.

Figura 32: Otimização do pH da amostra para as análises SBSE/LC.

O processo de dessorção dos fármacos (Figura 33) foi realizado a temperatura de 25°C, em um frasco cônico contendo 200 µL de fase móvel, sob banho de ultra-som. O equilíbrio de dessorção foi alcançado em 25 minutos. No entanto, o tempo de dessorção de 15 minutos foi escolhido para análises subseqüentes, para diminuir o tempo de análise, pois nestas condições o processo SBSE apresentou sensibilidade analítica adequada para a análise dos fármacos.

Após a limpeza da barra SBSE, entre as extrações, não foi observado a presença de interferentes, ou seja, efeito memória.

A robustez da barra SBSE é influenciada pela matriz analisada e pelos critérios ou cuidados do analista, como a lavagem das barras entre as extrações. O pH da fase móvel, tampão fosfato pH 3,8 e acetonitrila 53:47 (v/v) favoreceu o processo de dessorção, pois neste pH os analitos encontram-se na forma não iônica.

A barra PDMS/PPY foi reutilizada mais de 60 extrações sem perda da eficiência do processo SBSE. Desta forma, comprovamos a robustez da barra SBSE de PDMS/PPY desenvolvida.

Figura 33: Otimização do tempo de dessorção SBSE.

As melhores condições SBSE, entre as avaliadas, foram: 1 mL de amostra diluída em solução tampão borato pH 9,0, tempo de extração de 40 min a temperatura de 40°C, sob agitação magnética. O processo de dessorção foi realizado com a inserção da barra em um frasco cônico contendo 200µL de fase móvel a temperatura ambiente (25°C) durante 15 min, em banho de ultrassom.

4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

As morfologias das superfícies das barras de PDMS/PPY foram avaliadas por Microscopia Eletrônica de Varredura, Figura 34. A presença de poros na superfície do revestimento polimérico deverá aumentar a área ativa da superfície extratora.⁶⁹

Na superfície do revestimento da barra de PDMS/PPY (Figura 34a) observou-se a presença de estrutura porosa (PPY) e não-porosa (PDMS), já na barra de PDMS (Figura 34b), observou-se somente a estrutura não porosa. Quanto maior a área da superfície ativa polimérica, maior o número de sítios ativos disponíveis e, portanto uma seletividade e sensibilidade analítica adequada.

Figura 34: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (a) barra de PDMS/PPY (b) barra de PDMS.

A interação dos fármacos, através do processo de adsorção junto à superfície PDMS/PPY foi confirmada pelas análises de amostras de plasma enriquecidas somente com um fármaco (citalopram ou duloxetine), análise individual, e análises de amostras de plasma enriquecidas com todos os antidepressivos em estudo, análise simultânea (Figura 35).

(a)

(b)

Figura 35: Análise individual e simultânea para o antidepressivo (a) citalopram e (b) duloxetina, com a barra de PDMS/PPY e PDMS.

Segundo a Figura 35, nas amostras de plasma enriquecidas somente com citalopram ou duloxetine, a quantidade do fármaco extraído com a barra SBSE de PDMS/PPY foi maior, quando comparada à quantidade destes fármacos extraída nas amostras de plasma enriquecidas com todos os antidepressivos em estudo. Pois, não foi observado o processo de competição, nas análises individuais, pelos sítios ativos da superfície polimérica do polipirrol.

Nas extrações realizadas com a barra revestida de PDMS, as quantidades de fármacos extraídos foram próximas, tanto nas análises individuais das amostras de plasma enriquecidas com a duloxetine ou citalopram, quanto nas análises simultâneas. No revestimento de PDMS, o mecanismo de extração é por absorção, este processo é não competitivo em relação ao mecanismo de adsorção.

Além disso, para as análises individuais dos fármacos, citalopram ou duloxetine, com a barra de PDMS/PPY, não foi observado o equilíbrio de sorção no intervalo de tempo avaliado (30 a 50 minutos), enquanto que na análise simultânea, o tempo de equilíbrio de sorção foi alcançado após 40 minutos.

De acordo com os resultados ilustrados nas Figuras 34 e 35, a barra de PDMS/PPY extraiu os fármacos através dos processos de adsorção (PPY) e absorção (PDMS).

4.4 Validação analítica do método SBSE/LC padronizado

4.4.1 Especificidade/seletividade

A especificidade/seletividade do método padronizado é demonstrada pelos cromatogramas das análises de amostras de plasma branco de referência (Figura 36a), e amostras de plasma enriquecida com os antidepressivos, na concentração de 500 ng mL⁻¹ (Figura 36b).

Nestes cromatogramas não foram observados picos interferentes de compostos endógenos nos tempos de retenção dos analitos. A interferência de outros fármacos que os pacientes poderiam administrar concomitantemente com os antidepressivos analisados foram também avaliados. Segundo a Tabela 6, os fármacos analisados não co-eluíram com os analitos.

(a)

(b)

Figura 36: (a) cromatograma da amostra de plasma branco de referência (b) cromatograma da análise dos antidepressivos extraídos da amostra de plasma branco de referência enriquecida com os antidepressivos (1- mirtazapina, 2 - citalopram, 3 - paroxetina, 4 - duloxetina, 5 - fluoxetina, 6 - sertralina e 7 - clomipramina), na concentração de 500 ng mL^{-1} .

Tabela 6: Tempo de retenção dos fármacos analisados.

Drogas	Tempo de retenção (min)
Cafeína	2.00
Moclobemida	2.60
Diazepam	2.70
Carbamazepina	4,00
Mirtazapina	4,40
Citalopram	5.40
Nortriptilina	5.80
Paroxetina	6.30
Imipramina	6.80
Amitriptilina	6.80
Duloxetina	7.30
Fluoxetina	8.70
Sertralina	9,50
Clomipramina	10,5

Como pode ser observado nos cromatogramas das Figuras 37b e 24b, ocorreu uma pequena variação no tempo de retenção dos fármacos; isto foi devido à perda de eficiência na separação dos compostos pela coluna C₁₈ select B com o tempo de uso, ou adsorção irreversível de proteínas.

4.4.2 Linearidade

A linearidade do método SBSE/LC foi avaliada com amostras de plasma enriquecidas com padrões analíticos no intervalo de concentração correspondente ao limite de quantificação (LQ) a 500 ng mL⁻¹ (Tabela 7). A equação de regressão linear e o coeficiente de correlação linear para os fármacos são apresentados na Tabela 7.

Os intervalos avaliados foram lineares com coeficientes de determinação maiores que 0,993 (Tabela 7). As Figuras de 37 a 42 ilustram as curvas analíticas, utilizadas nas análises quantitativas dos antidepressivos nas concentrações (LQ, 50, 100, 300 e 500 ng mL⁻¹) com seus respectivos desvios padrão.

Figura 37: Curva analítica para o antidepressivo mirtazapina.

Figura 38: Curva analítica para o antidepressivo citalopram.

Figura 39: Curva analítica para o antidepressivo paroxetina.

Figura 40: Curva analítica para o antidepressivo duloxetina.

Figura 41: Curva analítica para o antidepressivo fluoxetina.

Figura 42: Curva analítica para o antidepressivo sertralina.

4.4.3 Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)

Os valores de limites de quantificação (LQ) do método SBSE/LC para todos os fármacos foram determinados como a menor concentração na curva de calibração e razão sinal/ruído maior ou igual 10. De acordo com a Tabela 7, o coeficiente de variação no LQ foi inferior a 15%, para todas as concentrações avaliadas, de acordo com as normas da ANVISA.

Os resultados obtidos de LQ apresentaram-se dentro do intervalo terapêutico (15 a 1000 ng mL⁻¹ para a 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) recomendado para os antidepressivos analisados⁶, mostrando que o método SBSE/LC padronizado pode ser aplicado para análise dos antidepressivos neste intervalo de concentração.

O limite de detecção (LD), correspondente o sinal analítico igual ou superior a três vezes o ruído da linha de base, o qual variou no intervalo de 5 a 20 ng mL⁻¹ para os antidepressivos analisados (Tabela 7).

Tabela 7: Regressão linear, LQ e LD para o método SBSE/LC.

Antidepressivos	Regressão linear (y = a + bx) LQ a 500 ng mL⁻¹	r²	LQ¹ (ng mL⁻¹)	CV (%) no LQ (n = 5)	LD² (ng mL⁻¹)
Mirtazapina	y = 0,109 + 0,0014 x	0,993	20,0	9,2	5,0
Citalopram	y = 0,018 + 0,0013 x	0,997	20,0	6,6	5,0
Paroxetina	y = 0,047 + 5,3. 10 ⁻⁴ x	0,994	30,0	8,9	10,0
Duloxetina	Y = 0,120 + 0,0023 x	0,994	20,0	13,2	5,0
Fluoxetina	y = 0,024 + 0,0022 x	0,998	30,0	3,6	10,0
Sertralina	y = 0,119 + 9,1. 10 ⁻⁴ x	0,998	50,0	2,8	20,0

¹ LQ: limite de quantificação, ² LD: limite de detecção.

4.4.4 Precisão inter ensaios e exatidão

A precisão inter ensaios do método SBSE/LC foi realizada em dias diferentes e avaliada utilizando-se amostras de plasma branco de referência, enriquecidas com padrões analíticos dos antidepressivos nas concentrações de 100, 300 e 500 ng mL⁻¹.

A precisão foi expressa pelo cálculo do coeficiente de variação (CV%) (Tabela 8), cujos valores obtidos foram menores que 14% para todos os fármacos analisados. Estes resultados mostraram que o método SBSE/LC apresenta precisão analítica adequada, para as análises de antidepressivos nas concentrações plasmáticas estudadas.

A exatidão foi determinada utilizando-se, 3 (três) concentrações (baixa, média e alta), as quais contemplaram o intervalo terapêutico, sendo realizadas 5 (cinco) determinações por concentração. Os valores obtidos variaram de 96 a 106%, os quais estão de acordo com as normas da ANVISA (Tabela 8).

Tabela 8: Precisão inter ensaios e exatidão para o método SBSE/LC em amostras de plasma.

Antidepressivos	Concentração Adicionada (ng mL⁻¹)	Concentração Obtida (ng mL⁻¹) ± DP	CV (%) (n = 5)	Exatidão (%) (n = 5)
Mirtazapina	100,0	102,1 ± 0,24	4,5	102
	300,0	295,3 ± 0,52	2,6	98
	500,0	506,8 ± 0,80	12,0	101
Citalopram	100,0	98,3 ± 0,14	13,3	98
	300,0	300,6 ± 0,40	2,5	100
	500,0	497,8 ± 0,66	4,0	99
Paroxetina	100,0	105,8 ± 0,01	14,0	105
	300,0	293,0 ± 0,20	3,8	97
	500,0	506,8 ± 0,31	2,2	101
Duloxetina	100,0	112,0 ± 0,35	6,8	112
	300,0	318,0 ± 0,81	2,8	106
	500,0	494,0 ± 1,27	1,4	98
Fluoxetina	100,0	103,0 ± 0,24	4,6	103
	300,0	289,0 ± 0,98	6,4	96
	500,0	495,0 ± 1,11	2,0	99
Sertralina	100,0	101,0 ± 0,21	6,3	101
	300,0	298,1 ± 0,39	2,2	99
	500,0	502,0 ± 0,57	2,2	100

4.4.5 Recuperação absoluta e relativa

As taxas de recuperação relativas e absolutas foram avaliadas em réplicas ($n = 5$), a partir das amostras de plasma (branco de referência) enriquecidas com padrões analíticos; que resultou nas concentrações de 50 e 500 ng mL⁻¹ (Tabela 9).

Os valores de recuperação absoluta e relativa obtidos foram satisfatórios nas concentrações analisadas, entre as quais os fármacos, mirtazapina e fluoxetina, apresentaram valores de recuperação absoluta maior ou igual a 60%. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária preconiza que serão aceitos valores de recuperação inferiores a 100%, desde que estes apresentem valores de precisão e exatidão analítica adequados.

Tabela 9: Valores das taxas de recuperação relativos e absolutos obtidas.

Antidepressivos	Recuperação (%)			
	Concentração adicionada			
	50 ng mL ⁻¹		500 ng mL ⁻¹	
	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta
Mirtazapina	53	56	83	71
Citalopram	44	46	43	31
Paroxetina	57	59	30	25
Duloxetina	39	40	50	36
Fluoxetina	49	50	76	65
Sertralina	51	52	52	45

4.5 Análise de amostras de plasma de pacientes: aplicação do método SBSE/LC

Para avaliação do método SBSE/LC-UV, padronizado e validado de acordo com as normas da ANVISA, para o uso clínico, foram utilizadas as amostras de plasmas de quatro pacientes em terapia com os antidepressivos duloxetina (Cymbalta® - 60 mg/dia), fluoxetina (Prozac® - 20 mg/dia) e sertralina (Zoloft® - 150 mg/dia).

O perfil dos picos cromatográficos dos analitos e suas resoluções são similares às aquelas obtidas em amostras de plasma branco de referência enriquecido com os antidepressivos. Também não foi observado nenhum pico interferente nos tempos de retenção dos antidepressivos analisados.

As concentrações plasmáticas determinadas nas amostras dos pacientes foram as seguintes: 434,8 ng mL⁻¹ para duloxetina (Figura 43a), 398,7 ng mL⁻¹ para fluoxetina (Figura 43b) e 554,0 ng mL⁻¹ para sertralina (Figura 43c).

Figura 43: Cromatogramas referentes as análise SBSE/LC de amostras de plasma de pacientes depressivos (a) duloxetina ($434,8 \text{ ng mL}^{-1}$), (b) fluoxetina ($398,7 \text{ ng mL}^{-1}$) e (c) sertralina ($554,0 \text{ ng mL}^{-1}$).

4.6 Comparação das metodologias SBSE-PDMS/PPY e SBSE-PDMS com a barra comercial

Com o intuito de demonstrar a equivalência entre as concentrações plasmáticas determinadas através dos métodos SBSE-PDMS/PPY e SBSE-PDMS⁴⁰ padronizados, seus parâmetros de validação analítica foram comparados. Os resultados encontram-se nas Tabela 10 e 11 e nas Figuras 44 a 48.

Tabela 10: Comparação dos valores de recuperação relativa e limite de quantificação para os métodos SBSE-PDMS/PPY e SBSE-PDMS.

Antidepressivos	Recuperação relativa (%) 50 ng mL ⁻¹		Limite de quantificação	
	SBSE-PDMS	SBSE-PDMS/PPY	SBSE-PDMS	SBSE-PDMS/PPY
Mirtazapina	57	53	40	20
Citalopram	92	44	10	20
Paroxetina	52	57	40	30
Fluoxetina	77	49	25	30
Sertralina	95	51	35	50

A competição dos analitos e dos compostos endógenos pelos sítios ativos da superfície da fase PDMS/PPY, através do processo de adsorção, influenciaram nas taxas de recuperação.

Os valores de LQ obtidos no método SBSE-PDMS/PPY foram próximos aos obtidos no método SBSE-PDMS; mostrando que ambos os métodos apresentaram sensibilidade analítica adequada para análise de antidepressivos em amostras de plasma.

A equivalência entre as concentrações plasmáticas determinadas através dos métodos SBSE-PDMS/PPY e SBSE-PDMS⁴⁰ padronizados foi comprovada através das equações de regressão linear e seus respectivos coeficientes de correlação (Figura 44 a 48).

Figura 44: Curva de regressão linear para o antidepressivo fluoxetina. As linhas tracejadas representam o limite de confiança de 95%.

Figura 45: Curva de regressão linear para o antidepressivo citalopram. As linhas tracejadas representam o limite de confiança de 95%.

Figura 46: Curva de regressão linear para o antidepressivo mirtazapina. As linhas tracejadas representam o limite de confiança de 95%.

Figura 47: Curva de regressão linear para o antidepressivo sertralina. As linhas tracejadas representam o limite de confiança de 95%.

Figura 48: Curva de regressão linear para o antidepressivo paroxetina. As linhas tracejadas representam o limite de confiança de 95%.

Para as equações de regressão linear os valores de $a = 0$ e $b = r = 1$ são desejáveis, porém devidos aos erros sistemáticos, esta condição na realidade não ocorre. Empregando o limite de confiança, assumimos a ausência de qualquer erro sistemático.⁸⁴

De acordo com as curvas de regressão linear (Figuras 45 a 49), as quais foram plotadas dentro do limite de confiança de 95%, os valores de r foram próximos de 1, assim como os valores de b (Tabela 11), demonstrando que ambos os métodos SBSE são equivalentes no intervalo de concentração plasmática de 50 a 500 ng mL⁻¹.

Tabela 11: Equação de regressão linear, coeficiente de correlação (r) no limite de confiança de 95% para as amostras de plasma enriquecidas com os antidepressivos (50 a 500 ng mL⁻¹).

Fármacos	Equação de regressão linear $y = a + bx$	Coeficiente de correlação (r)
Mirtazapina	$-0,64 \pm 9,74 + 0,99 \pm 0,03 x$	0,9987
Citalopram	$10,88 \pm 8,39 + 1,04 \pm 0,03 x$	0,9984
Paroxetina	$4,38 \pm 11,06 + 0,99 \pm 0,03 x$	0,9984
Fluoxetina	$16,04 \pm 6,36 + 0,97 \pm 0,02 x$	0,9979
Sertralina	$0,56 \pm 2,14 + 1,06 \pm 0,007 x$	0,9998

5 PERSPECTIVAS FUTURAS

A avaliação de novas fases extratoras SBSE, mais hidrofílicas, com grupos iônicos ou imunosorventes ligadas à superfície extratora, permitirão a padronização de métodos cromatográficos mais seletivos/específicos e de alta sensibilidade analítica para a análise de fármacos em fluido biológicos.

A influência das proteínas e suas ligações aos fármacos, também deverão ser avaliadas no processo SBSE, visando aumentar as taxas de recuperação.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A otimização das variáveis SBSE: tempo e temperatura de extração, tempo de dessorção e pH da matriz biológica, baseada no equilíbrio de sorção dos analitos entre as fases: polimérica (PDMS/PPY) e fluido biológico, permitiu a determinação dos analitos em concentrações plasmáticas que contemplam o intervalo terapêutico.

A presença de estrutura porosa (PPY) e não porosa (PDMS) na superfície polimérica da barra extratora SBSE-PDMS/PPY foi confirmada através das análises por Microscopia Eletrônica de Varredura. De acordo, com os resultados obtidos nas análises de MEV e nas análises (individuais e simultâneas) de amostras de plasma enriquecidas com os analitos, os mecanismos de retenção dos fármacos junto à superfície PDMS/PPY ocorreram através dos processos de adsorção (PPY) e absorção (PDMS).

A validação analítica foi realizada segundo as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. O método padronizado apresentou linearidade no intervalo de concentração plasmática que variou dos limites de quantificação a 500 ng mL^{-1} , com coeficientes de determinação maiores que 0,994, precisão inter ensaios com coeficientes de variação menores que 15% e exatidão de 96% a 106%. Os valores de limites de quantificação obtidos são congruentes com a menor concentração plasmática do intervalo terapêutico preconizado.

Segundo os parâmetros de validação analítica investigados, o método SBSE-PDMS/PPY apresentou sensibilidade, linearidade, especificidade, precisão, exatidão e robustez adequados para análise dos antidepressivos

(mirtazapina, citaloporam, paroxetina, duloxetina, fluoxetina e sertralina) em amostras de plasma, para fins de monitorização terapêutica.

O método SBSE - PDMS/PPY padronizado e validado foi utilizado para determinações dos antidepressivos sertralina, duloxetina e fluoxetina em amostras de plasma de pacientes, em terapia com estes fármacos. Desta forma, o método SBSE-PDMS/PPY poderá ser empregado para fins de monitorização terapêutica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 PACHER, P., KOHEGYI, E., KECSKEMETI, V., FURST, S. Current trends in the development of new antidepressants, **Curr. Med. Chem.** vol. 8, n. 2, p.89 - 100, 2001.

2 MARQUES, A.H., CIZZA, G., STERNBERG, E. Interações imunocerebrais e implicações nos transtornos psiquiátricos. **Rer. Bra. Psiquiatr.** vol. 29, sulp. 1, p.27 - 32, 2007.

3 KAPLAN, H.I.; SADOCK, BB.J.; GREAB, J.A. **Compêndio de Psiquiatria**. 7. ed. Porto Alegre. Artmed, 1997.

4 MORENO, R. A., MORENO D. H., SOARES, M. B. M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Rev. Bras. Psiquiatr.** vol. 21, supl. 1, p. 24 - 40, 1999.

5 GOODNICK PJ, GOLDSTEIN BJ. Selective serotonin reuptake inhibitors in affective disorders: Basic pharmacology. **J. Psychopharmacol.** vol. 12, n. 3 suppl B, p. 3 - 20, 1998.

6 TOURNEL, G., HOUDRET, N., HEDOUIN, V., DEVEAUX, M., GOSSET, D., LHERMITTE, M. High-performance liquid chromatographic method to screen and quantitate seven selective serotonin reuptake inhibitors in human serum. **J. Chromatogr. B.** vol. 761, n. 2, p.147 -158, 2001.

7 FAWCETT J, BARKIN RL. Review of the clinical studies on the efficacy, safety and tolerability of mirtazapine for the treatment of patients with major depression. **J Affect. Disord.** vol. 51, n. 3, p. 267 - 86, 1998.

8 DUNNER, D.L., GOLDSTEIN, D.J., MALLINCKRODT, C., LU, LI., DETKE, M.J. Theoretical Review: Duloxetine in treatment of anxiety symptoms associated with depression. **Depress. Anx.** vol. 18, p. 53 - 61, 2003.

9 WORDEN, J. P. Therapeutic drug monitoring. **Curr. Surg.**, vol. 51, n. 7, p.4299 - 435, 1994.

10 TAYLOR, W.J., ROBINSON, J.D., SPIVEY-MILLER, S., Handbook therapeutic monitoring. 2 ed. Cincinnati: Harvey Whitney Books Company, p. 1-10, 1993.

11 QUEIROZ. M.E.C., LANÇAS, F.M. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida "no tubo" e cromatografia líquida de alta eficiência. **Quím. Nova.** vol. 28, n. 5, p. 880 - 886, 2005.

12 MOLDOVEANU, S., DAVID, V., Sample Preparation in Chromatography, **J. Chromatogr.Library**, vol. 65, Elsevier, Amsterdam, 2001.

13 LISKA, I., Fifty years of solid-phase extraction in water analyses: historical development and overview. **J. chromatogr. A.** vol. 885, n. 1, p. 3 -16, 2000.

14 BRIGUENTI, A. C. B., BONATO, P.S. Análise simultânea da mirtazapina e *N*-desmetilmirtazapina em plasma empregando a cromatografia líquida de alta eficiência. **Rev. Bras. Ciênc. Farmac.** vol. 41, n. 4, p. 429 - 435, 2005.

15 MALFARÁ, W.R. BERTUCCI, C., QUEIROZ, M.E.C., QUEIROZ, R.H.C., *et al.* Reliable LC method for therapeutic drug monitoring of frequently prescribed tricyclic and nontricyclic antidepressants. **J. Pharm. Biomed. Anal.** vol. 44, n. 4, p. 955 - 962, 2007.

16 LANÇAS, F.M. Extração em fase sólida (SPE). Editora Rime, São Carlos, 2004. 96 p.

17 JUAN, H., ZHILING, Z., HUANDE, L. Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography – electrospray ionization mass spectrometry (LC–MS/ESI). **J. Chromatogr. B.** vol. 820, n. 1, p. 33 - 39, 2005.

18 SABBIONI, C., BUGAMELLI, F., VARANI, Z., MERCOLINI, L., RAGGI, M.A. A rapid LC-DAD method for the analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma from overdose patients **J. Pharm. Biomed. Anal.** vol 36, n. 2, p. 351 - 356, 2004.

19 VALENTE, A.L.P., AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida, **Quim. Nova**, vol. 23, n. 4, p. 1 -19, 2002.

20 KATAOKA, H., Automated sample preparation using in-tube solid-phase microextraction and its application – a review, **Anal Bioanal. Chem.** n. 373, p.31 - 45, 2002.

21 PAWLISZYN, J. Applications of solid phase microextraction. **Royal Soc. Chem.** Cambridge, 1999.

22 PAWLISZYN, J. Theory of solid phase microextraction. **J. Chromatogr. Sci.** vol. 38, n. 7, p. 270 - 278, 2000.

23 SOUZA, D.A. LANÇAS, F.M. Solvents sample preparations for pesticides analyses in environmental water samples using solid phase microextraction high resolution gas chromatography/ mass spectrometry (SPME/HRGC/MS). **J. Environ. Sci.** vol. 40, n. 9, p. 417 - 428, 2003.

24 WALLIS, 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 spectrometry. **J. Chromatogr. A.** vol. 1025, n. 1, p. 85 - 92, 2004.

25 JINNO, K., TANIGUCHI, M., HAYASHIDA, M. S. Solid phase microextraction coupled with semi microcolumn high performance liquid chromatography for the analyses of benzodiazepines in human urine. **J. Pharm. Biomed. Anal.** vol. 17, p.1081,1998.

26 SUPELCO, Cromatografia – produtos para análises e purificação (Catálogo). Pág. 355, 2003-2004.

27 QUEIROZ, M.E. C., SILVA, S.M., CARVALHO, D., LANÇAS, F.M. Solid phase microextraction liquid chromatography (SPME/LC) determination of lamotrigine simultaneously with carbamazepine and carbamazepine 10,11-epoxide in human plasma. **J. Sep. Sci.** vol. 25, n. 1-2, p. 91 - 95, 2002.

28 QUEIROZ, M. E. C., VALADÃO, C. A. A., FARIAS, A., CARVALHO, D., LANÇAS, F. M., Determination of amitraz in canine plasma by solid-phase microextraction – gas chromatography with thermionic specific detection (SPME - GC/TSD). **J. Chromatogr. B.** vol. 794, n. 2, p. 342 - 350, 2003.

29 LOCK, C. M., CHEN L. D. A. VOLMER. Rapid analysis of tetracycline antibiotics by combined solid phase microextraction/high performance liquid chromatography/mass. **Rapid Comm. Mass Spectrom.** vol.13, n. 17, p.1744 - 1754, 1999 .

30 VOLMER, D. A, HUI , J. P. Rapid determination of corticosteroids in urine by combined solid phase microextraction/liquid chromatography/mass/spectrometry . **Rapid Comm. Mass Spectrom.** vol. 11, n. 17, p. 1926 -1934, 1997.

31 VOLMER, D. A., HUI, J. P. Study of *Erythromycin* a decomposition product in aqueous solution by solid phase microextraction/ liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom.** vol. 12, n. 13, p. 123 - 129, 1998.

32 BALTUSSEN, E., SANDRA, P., DAVID, F., CRAMERS, C., Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), a Novel Extraction Technique for Aqueous Samples: Theory and Principles. **J. Microcol. Sep.**, vol.101, n.10, p. 737 - 747, 1999.

33 DAVID, F., SANDRA, P., Sirt bar sorptive extraction for trace analysis, **J. Chromatogr. A.** vol.1152, n. 1-2, p. 54 - 69, 2007.

34 DAVID, F., TIENPONT, B., SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction of trace organic compounds from aqueous matrices. **LCGC North América**, New York, vol. 21, n.2, p. 1 - 7, 2003.

35 TIENPONT, B., DAVID, F., DESMET, K., SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction–thermal desorption–capillary GC–MS applied to biological fluids **Anal. Bioanal. Chem.** vol. 373, n. 1-2, p. 46 - 55, May. 2002.

36 BICCHI, C., CORDERO, C., SANDRA, P. Impact of phase ratio, polydimethylsiloxane volume and size, and sampling temperature and time on headspace sorptive extraction recovery of some volatile compounds in the essential oil field. **J. Chromatogr. A.** vol. 1071, n. 1-2, p. 111 - 118, 2005.

- 37 ALVES, C., FERNANDES, C., NETO, A.J.S., RODRIGUES, J.S., QUEIROZ, M.E.C., LANÇAS, F.M. Optimization of the SPME Parameters and Its Online Coupling with LC for the Analysis of Tricyclic Antidepressants in Plasma Samples. **J. Chromatogr. Sci.**, vol. 44, p. 340 - 346, 2006.
- 38 LORD, H., PAWLISYN, J. Microextraction of drugs. **J. Chromatogr. A.** vol. 902, n. 1, p. 17 - 63, 00.
- 39 ULRICH, S. Solid phase microextraction in biomedical analyses. **J. Chromatogr. A.** vol. 902, n. 1, p. 167 - 194, 2000.
- 40 CHAVES, R., SILVA, S.M., QUEIROZ, R.H.C., LANÇAS, F.M., QUEIROZ, M.E.C. Stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with UV detection for determination of antidepressants in plasma samples. **J. Chromatogr. B.** vol. 850, n. 1-2, p. 295 - 303, 2007.
- 41 FERNANDES, C., JIAYU, P., SANDRA, P., LANÇAS, F. M. Stir bar sorptive extraction LC/MS for the analysis of fluoxetine in plasma. **Chromatographia** vol. 64, n. 9, p. 217 - 521, 2006.
- 42 DAVID, F., TIEPONT, B., SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction of trace organic compounds from aqueous matrices. **Sample Preparation Perspectives**, LC-GC North América, New York, vol. 21, n. 2, p. 1 - 7, 2003.

43 NAKAZAWA, H., KAWAGUCHI, M., ITO, R., SAKUI, N. *et al*, Stir-bar-sorptive extraction, with in-situ deconjugation, and thermal desorption with in-tube silylation, followed by gas chromatography-mass spectrometry for measurement of urinary 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol glucuronides. **Anal. Bioanal. Chem.** vol. 388, n. 2, p. 391 - 398, 2007.

44 NAKAZAWA, H., KAWAGUCHI, M., INOUE, K., Determination of bisphenol A in river water and body fluid samples by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography–mass spectrometry. **J. Chromatogr. B**, vol. 805, n.1, p. 41 - 48, 2004.

45 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. **J. Pharm. Biomed. Anal.** vol. 41, n. 4, p. 1303 - 1311, 2006.

46 ADRIANA STOPFORTH, A., GROBBELAAR, C.J., CROUCH, A., SANDRA, P. Quantification of testosterone and epitestosterone in human urine samples by stir bar sorptive extraction – thermal desorption – gs chromatography/mass spectrometry: Application to HIV-positive urine samples. **J. Sep. Sci.** vol. 30, n. 2, p. 257 - 265, 2007.

47 STOPFORTH, A., TREDoux, A., CROUCH, A., HELDEN, P., SANDRA, P. Rapid method of diagnosing pulmonary tuberculosis using stir bar sorptive

extraction thermal desorption gas chromatography mass spectrometry. **J. Chromatogr. A.** vol. 1071, n. 1-2, p. 135 - 139, 2005.

48 SERÓDIO, P., CABRAL, M.S., NOGUEIRA, J.M.F. Use of experimental design in the optimization of stir bar sorptive extraction for the determination of polybrominated diphenyl ethers in environmental matrices. **J. Chromatogr. A.** vol.1141, n. 2, p. 259 - 270, 2007.

49 SERÓDIO, P., NOGUEIRA, J.M.F. Development of a stir bar sorptive extraction liquid desorption large volume injection capillary gas chromatographic–mass spectrometric method for pyrethroid pesticides in water samples. **Anal. Bioanal. Chem.** vol. 382, n. 4, p. 1141 - 1151, 2005.

50 BLASCO, C., FONT, G., PICO, Y. Comparison of microextraction procedures to determine pesticides in oranges by liquid chromatography–mass spectrometry. **J. Chromatogr. A.** vol. 970, n. 1 -2, p. 201 - 212, 2002.

51 MONTERO, L., CONRADI, S., WEISS, H., POPP, P. Determination of phenols in lake and ground water samples by stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. **J. Chromatogr. A.** vol.1071, n. 1-2, p. 163 - 169, 2005.

52 POPP, P., BAUER, C., WENNRICH, L. Application of stir bar sorptive extraction in combination with column liquid chromatography for the

determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. **Anal. Chim. Acta.** vol. 436, n.2, p. 1 - 9, 2001.

53 KAWAGUCHI, M., INOUE, K., YOSHIMURA, M., SAKUI N., OKANOUCHI, N., ITO, R., YOSHIMURA, Y., NAKAZAWA, H., Trace analysis of phenolic xenoestrogens in water samples by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. **J. Chromatogr. A.** vol. 1041, n. 1-2, p. 19 - 26, 2004.

54 KAWAGUCHI, M., ISHII, Y., SAKUI, N., OKANOUCHI, N., ITO, R., SAITO, K., NAKAZAWA, H., Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry for determination of chlorophenols in water and body fluid samples. **Anal. Chim. Acta.** vol. 533, n. 1, p. 57 - 65, 2005.

55 M. KAWAGUCHI, R. ITO, N. SAKUI, N. OKANOUCHI, K. SAITO, H. NAKAZAWA, Dual derivatization stir bar sorptive extraction thermal desorption gas chromatography–mass spectrometry fordetermination of 17-estradiol in water sample. **J. Chromatogr. A.** vol.1105, n. 1-2, p. 140 - 147, Feb. 2006.

56 SERÓDIO, P., NOGUEIRA, J.M.F. Considerations on ultra-trace analysis of phthalates in drinking water. **Water Research.** vol. 40, n. 13, p. 2572 - 2583, 2006.

57 RODIL, R., POPP, P. Development of pressurized subcritical water extraction combined with stir bar sorptive extraction for the analysis of organochlorine pesticides and chlorobenzenes in soils. **J. Chromatogr. A.** vol. 1124, n. 1-2, p. 82 - 90, 2006.

58 MARÍN, J., ZALACAIN, A., MIGUEL, C. D., ALONSO, G.L., SALINAS, M.R. Stir bar sorptive extraction for the determination of volatile compounds in oak-aged wines. **J. Chromatogr. A.** vol. 1098, n. 1-2, p. 1 - 6, 2005.

59 LIU, W., HU, Y., ZHAO, J., XU, Y., GUAN, Y., Determination of organophosphorus pesticides in cucumber and potato by stir bar sorptive extraction. **J. Chromatogr. A.** vol. 1095, n. 1-2, p. 1 - 7, 2005.

60 LIU, W., HU, Y., ZHAO, J., XU, Y., GUAN, Y., Physically incorporated extraction phase of solid-phase microextraction by sol-gel technology. **J. Chromatogr. A.** vol. 1102, n. 1-2, p. 37 - 43, 2006.

61 DÍEZ, J., DOMINGUEZ, C., GUILLÉN, D.A., VEAS, R., BARROSO, C.G. Optimisation of stir bar sorptive extraction for the analysis of volatile phenols in wines. **J. Chromatogr. A.** vol. 1025, n. 2, p. 263 - 267, 2004.

62 DEMYTTENAERE, J.C.R., MARTINEZ, J.I.S., VERHE, R., SANDRA, P., DE KIMPE, N.J. Analysis of volatiles of malt whisky by solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction. **J. Chromatogr. A.** vol. 985, p. 221 - 232, 2003.

63 GUERRERO, E.D., MARIN, R.N., MEJIAS, R.C., BARROSO, C.G.,
Optimisation of stir bar sorptive extraction applied to the determination of
volatile compounds in vinegars. **J. Chromatogr. A.** vol. 1104, n. 1-2, p. 47 - 53,
2006.

64 DEMYTTENAERE, J.C.R., MORINA, R.M., KIMPE, N.D., SANDRA, P. Use
of headspace solid-phase microextraction and headspace sorptive extraction for
the detection of the volatile metabolites produced by toxigenic *fusarium* species.
J. chromatogr. A. vol. 1027, n. 1-2, p. 147 - 154, 2004.

65 SANDRA, P., TIENPONT, B., VERCAMMEN, J., TREDoux, A., SANDRA,
T., DAVID, F. Stir bar sorptive extraction applied to the determination of
dicarboximide fungicides in wine. **J. Chromatogr. A.** vol. 928, n. 1-2, p. 117 -
126, 2001.

66 LAMBERT, J-H., MULLETT, 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, **J. Chromatogr. A**, vol.1075, n. 1-2,
p. 43 - 49, 2005.

67 BICCHI, C., CORDERO, C., LIBERTO, E., RUBIOLO, P., SGORBINI, B.,
DAVID, F., SANDRA, P., Dual-phase twistors: A new approach to headspace
sorptive extraction and stir bar sorptive extraction . **J. Chromatogr. A**, vol.1094,
n. 1-2, p. 9 -16, 2005.

- 68 LIU, W., WANG, H., GUAN, Y., Preparation of stir bars for sorptive extraction using sol–gel technology. **J. Chromatogr. A**, vol.1045, n. 1-2, p. 15 - 22, 2004.
69. QUEIROZ, S.C.N., COLLINS, C.H., JARDIM, I.C.S.F., Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica, **Quim. Nova**, vol. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.
- 70 WU, J.,PAWLISZYN, J., Polypyrrole-Coated Capillary Coupled to LC for In-Tube Solid-Phase Microextraction and Analysis of Aromatic Compounds in Aqueous Samples. **Anal. Chem.** vol. 73, n. 3, p. 55 - 63, 2001.
- 71 JINGCUN, W., MULLETT, W., PAWLISZIN, J., Electrochemically Controlled Solid-Phase Microextraction Based on Conductive Polypyrrole Films, **Anal. Chem.**, vol. 74, n. 18, p. 4855, 2002.
- 72 GHASSEMPOU, A., NAJAF, N.; MEHDINIA, A., DAVARANI, S. H., Analysis of anatoxin-a using polyaniline as a sorbent in solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry **J. Chromatogr. A**, vol.1078, n. 1-2, p.120 -127, 2005.

73 PAWLISZYN, J.; JINGCUN, W. Solid-phase microextraction based on polypyrrole films with different counter ions, **Anal. Chim. Act.**, vol. 520, n. 1-2, p. 257 - 264, 2004.

74 MINJIA, H., QUFANG, Z.C., GUIBIN, J., Preparation of polyaniline coating on a stainless-steel wire using electroplating and its application to the determination of six aromatic amines using headspace solid-phase microextraction, **J.Chromatogr. A**, vol.1048,n.2, p. 257- 262, 2004.

75 WALLEES, M.; MULEETT, W.M.; LEVSEN, K.; PAWLISZYN, J., Verapamil drug metabolism studies by automated in-tube solid phase microextraction, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, vol. 30, n. 2, p. 307 - 319, Sep. 2002.

76 GÓRECKI, C., YU, PAWLISZYN, J. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. **Analyst** vol. 124, p. 643 - 649, 1999.

77 CHO, H-J., BAEK, K., LEE ,H-H., LEE, S-H., YANG, J-W., Competitive extraction of multi-component contaminants in water by Carboxen–polydimethylsiloxane fiber during solid-phase microextraction, **J. Chromatogr. A** , vol. 988, n. 2, p.177-184, 2002.

78 TUDURI, V., DESAUZIERS, V., FANLO, J.L. Potential of Solid-Phase Microextraction Fibers for the Analysis of Volatile Organic Compounds in Air. **J. Chromatogr. Sci.**, vol. 39, n. 12, p. 521 - 529, 2001.

79 TONHI, E., COLLINS, K.E., JARDIM, I.C.S.F., COLLINS, C.H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE–FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados.

Quim. Nova, vol. 25, n. 4, p. 616 - 623, 2002.

80 COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. Fundamentos de Cromatografia. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006. ISBN 85-268-0704-8.

81 Disponível em: <http://www.lcresources.com/resources/getstart>. Acesso em 18 de setembro, 2007.

82 ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução – RE nº899, maio 2003.

83 RIBANI, M., BOTTOLI, C.B.G., COLLINS, C.H., JARDIM, I.C.S.F., MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, vol. 27, n. 5, p. 771 - 780, 2004.

84 MILLER, J.C., MILLER, J.N. Statistics for analytical chemistry. England, Ellis Horwood Limited, 1993. 233 p.