Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de pós graduação em Química

Desenvolvimento de uma fase extratora com polímeros de impressão molecular para extração em fase sólida de Venlafaxina, O-desmetilvenlafaxina e N-desmetilvenlafaxina em amostras de plasma e análises por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem (UHPLC-MS/MS).

Luis Felipe Cabral Miranda

Dissertação 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**

RIBEIRÃO PRETO – SP

2015

Luis Felipe Cabral Miranda

Desenvolvimento de uma fase extratora com polímeros de impressão molecular para extração em fase sólida de Venlafaxina, O-desmetilvenlafaxina e N-desmetilvenlafaxina em amostras de plasma e análises por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem (UPLC-MS/MS).

Dissertação 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: Prof^a Dr^a Maria Eugênia Queiroz
Nassur**

"Versão corrigida".

RIBEIRÃO PRETO – SP

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Miranda, Luis Felipe Cabral

Desenvolvimento de uma fase extratora com polímeros de impressão molecular para extração em fase sólida de Venlafaxina, O-desmetilvenlafaxina e N-desmetilvenlafaxina em amostras de plasma e análises por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem (UPLC-MS/MS).

106 p. :il. ; 30cm

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

Orientadora: Nassur, Maria Eugênia Queiroz.

1. Extração em fase sólida molecularmente impressa. 2. Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem (UPLC-MS/MS). 3. Venlafaxina. 4. Plasma.

Titulo: Desenvolvimento de uma fase extratora com polímeros de impressão molecular para extração em fase sólida de Venlafaxina, O-desmetilvenlafaxina e N-desmetilvenlafaxina em amostras de plasma e análises por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem (UPLC-MS/MS).

Dissertação 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**

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Queiroz Nassur

Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira

Aos meus pais, pelo apoio, amor,
carinho, companheirismo, exemplo
e motivação!

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof^a Maria Eugênia, por estar sempre presente, orientando com dedicação, compreensão, amizade e paciência. Pelas discussões que tanto contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho e para minha formação.

A minha mãe Maria Helena e meu pai Jair Miranda pelo exemplo, apoio, amor e carinho e companheirismo sempre contribuindo para que eu pudesse completar com sucesso cada etapa de minha vida.

A minha namorada Juliana que está sempre presente, se preocupando, cuidando, compartilhando de momentos bons e ruins, sempre me apoiando, trazendo motivação, alegria e ajuda.

Aos amigos do laboratório, Israel, Diego, Tamires, Mônia, Vinicius, Mércia, Lidervan e Mariane pelo companheirismo, apoio e ajuda.

A toda minha família pelo apoio, incentivo e companheirismo.

Aos professores Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira, Ana Paula Ramos, Luiz Alberto Beraldo de Moraes e seus alunos, pela disponibilidade de materiais, companheirismo e ajuda.

A minha segunda família que faço parte a mais de 4 anos, sempre me apoiando, me recebendo com carinho e que com certeza ajudou de forma indireta à conclusão deste trabalho

A todos meus amigos, próximos e distantes, de amizade mais nova ou de infância, que com certeza contribuíram muito através de momentos de amizade, conversas e entretenimento. Dentre estes tenho que destacar meu amigo Marcelo Gonçalves que, apesar de ser chato pra caramba, está sempre presente, alimentando nossa amizade desde a infância.

Ao departamento de química pela oportunidade e a CAPES pelo apoio financeiro.

“Quanto mais nos elevamos, menores parecemos aos olhos daqueles que não sabem voar” - Friedrich Wilhelm Nietzsche

RESUMO

MIRANDA, L. F. C. **Desenvolvimento de uma fase extratora com polímeros de impressão molecular para extração em fase sólida de Venlafaxina, O-desmetilvenlafaxina e N-desmetilvenlafaxina em amostras de plasma e análises por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem (UPLC-MS/MS).** 2015. 106 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

A venlafaxina (VEN), em razão de sua eficácia e brandos efeitos adversos, tem sido um dos antidepressivos mais prescritos no tratamento da depressão e ansiedade. Neste trabalho, um método analítico empregando as técnicas MISPE miniaturizada e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em Tandem, foi utilizado para a determinação de VEN e seus principais metabólitos em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica.

A fase MIP foi sintetizada via polimerização radicalar por precipitação, fazendo uso de VEN (molécula molde), ácido metacrílico (monômero funcional), etileno glicol dimetacrilato, (reagente reticulante) e 2,2 azobisisobutironitrila (iniciador radicalar) em tolueno (solvente). Para controle utilizou-se o polímero não impresso (NIP), sintetizado por procedimento análogo ao do MIP, porém sem o uso da molécula molde. A caracterização química e estrutural dos polímeros foi realizada por espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier e microscopia eletrônica de varredura. A otimização das variáveis de MISPE miniaturizada favoreceu a detectabilidade analítica e diminuiu o efeito de memória.

As extrações realizadas com MIP apresentaram taxa de recuperação de 84% para VEN e de 2-28% para os antidepressivos (clorpromazina, fluoxetina, clomipramina, imipramina e sertralina). O polímero não impresso apresentou baixa recuperação para a VEN (taxa de recuperação: 49%) e para os demais antidepressivos (taxas de recuperação menores que 40%). Estes experimentos comprovam a seletividade da fase MIP desenvolvida.

O método padronizado apresentou linearidade na faixa de 3 a 700 ng mL⁻¹ para VEN, 5 a 700 ng mL⁻¹ para O-desmetilvenlafaxina (ODV) e de 3 a 500 ng mL⁻¹ para N-desmetilvenlafaxina (NDV), precisão com coeficientes de variação menores que 15% e exatidão com valores de erro padrão relativo na faixa de -11,8 a 16,01 %. As concentrações correspondentes aos limites inferiores de quantificação para VEN (3 ng mL⁻¹) e ODV (5 ng mL⁻¹) foram inferiores aos intervalos terapêuticos preconizados. O método desenvolvido, quando comparado a aos métodos da literatura para determinação de VEN e metabolitos, apresentou maior seletividade, menor consumo de amostra e de solventes orgânicos e permitiu a reutilização da fase extratora. Segundo os parâmetros de validação analítica avaliados e amostras de pacientes em terapia com VEN analisadas, o método proposto é adequado para determinação de VEN, ODV e NDV em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica.

Palavras chaves: Venlafaxina, Polímeros molecularmente impressos, cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem (UHPLC-MS/MS) e plasma.

Abstract

MIRANDA, L. F. C. **“Development of an extraction phase with molecularly imprinted polymers for solid phase extraction of venlafaxine, o-desmethylvenlafaxine, and n-desmethylvenlafaxine in plasma samples and analysis by Ultra Performance Liquid Chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS).** 2015. 106 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Venlafaxine elicits a small number of adverse effects, so it is one of the most frequently prescribed drugs to treat major depression, generalized anxiety, and social anxiety disorders in adults. In this study, venlafaxine (VEN), O-desmethylvenlafaxine (ODV), and N-desmethylvenlafaxine (NDV) were pre-concentrated with the aid of miniaturized SPE based on MIPs as extraction phase. MIPs are synthetic polymers with cavities specifically designed to hold a target molecule or structurally similar compounds.

The molecularly imprinted polymers were prepared by addition of VEN, metacrylic acid (MAA, monomer), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA, cross-linker), and 2,2-azobisisobutyronitrile (AIBN, initiator) to toluene (solvent). The non-imprinted polymer (NIP), used for comparison, was also synthesized by following exactly the same procedure, but excluding the template VEN from the formulation. The polymer was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM). Optimization of the MIP phase extraction variables favored miniaturized analytical detectability and reduced the memory effect.

The extractions performed with the synthesized MIP showed recovery rate of 84% for VEN and 2-28% for other antidepressants (chlorpromazine, fluoxetine, clomipramine, imipramine, and sertraline). The non-imprinted polymer provided low recovery of VEN (recovery rate: 49%) and other antidepressants (recovery rates lower than 40%). These experiments demonstrated the selectivity of the developed MIP phase.

The standardized method was linear in the range of 300 - 700 ng mL⁻¹ for VEN, 5-700 ng mL⁻¹ for ODV, and 3 to 500 ng mL⁻¹ for NDV. Precision had coefficients of variation smaller than 15%; the accuracy standard error values ranged from -11.8 to 16.01%. Compared with literature methods, the developed method was more selective for determination of VEN and metabolites, required lower consumption of sample and organic solvents, and enabled reuse of the extraction phase. According to the assessed analytical validation parameters and to the analysis of samples obtained from patients undergoing therapy with VEN, the proposed method is suitable to determine VEN, NDV, and ODV in plasma samples for therapeutic drug monitoring.

Key words: Venlafaxine, Molecularly Imprinted Polymers, Ultra Performance Liquid Chromatography tandem mass spectrometry, and plasma.

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura Química da (a) Venlafaxina, (b) O-desmetilvenlafaxina, (c) N-desmetilvenlafaxina.....	22
Figura 2: : Esquema geral para síntese dos MIPs.....	31
Figura 3: Estrutura química dos principais monômeros empregados no preparo de MIPs: (a) ácido metacrílico, (b) ácido p-vinilbenzóico, (c) ácido acrílico, (d) acrilamida, (e) 4-vinilpiridina, (f) 2-vinilpiridina e (g) 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS, precursor no processo sol-gel).....	34
Figura 4: Reagentes reticulantes mais utilizados na síntese dos MIP via radicalar (a) p-divinilbenzeno e (b) etileno glicol dimetacrilato. Precursor geralmente utilizado em polimerizações via sol gel: (c) tetraetilortosilicato.....	34
Figura 5: (a) Início: Radical primário ($R^\bullet$) reage com dupla ligação do monômero dando origem ao radical iniciador; (b) Propagação: radical iniciador reage com os monômeros funcionais no meio reacional; (c) Término: mecanismo de recombinação onde 2 macro radicais reagem originando uma macrocadeia polimérica (R_2 = cadeia composta por monômeros funcionais que foram incorporados na molécula durante a polimerização); (d) Término: mecanismo de desproporcionamento, onde o carbono radicalar interage com um centro eletrofílico (H), originando uma cadeia polimérica com instauração e outra com uma ligação simples C-H no fim da cadeia.....	38
Figura 6: Métodos mais utilizados para síntese de polímeros molecularmente impressos.....	41
Figura 7: Sistema SPE miniaturizado com filtros de microseringa de polipropileno com membrana de celulose regenerada.....	43
Figura 8: Esquema de síntese otimizado para impressão molecular da VEN.....	67
Figura 9: Micrografias dos polímeros sintetizados em acetonitrila (a) MIP ₁ (VEM:MAA 1:5 mmol), e em tolueno (b) MIP ₄ (VEM:MAA 1:4 mmol) e (c) NIP ₄	68
Figura 10: Espectro FTIR para (a) MIP ₄ e (b) NIP ₄	70
Figura 11: Avaliação de diferentes soluções e solventes utilizados na pré concentração de VEN na fase MIP. pH = 8 = solução tampão fosfato de sódio 0,01 mol L ⁻¹ em pH 8; pH = 10 = solução tampão borato de sódio 0,01 mol L ⁻¹ em pH 10; pH = 11 = solução tampão fosfato de sódio 0,01 mol L ⁻¹ em pH 11.	72

Figura 12: Avaliação do metanol e acetonitrila no processo de dessorção (MISPE).....	73
Figura 13: Avaliação do volume de metanol na etapa de dessorção.....	74
Figura 14: Avaliação do volume das soluções de lavagem [MeOH:ACN 50:50 (v/v) e MeOH/água 50:50 (v/v)]	75
Figura 15: Estrutura dos íons envolvidos nas transições MS/MS de VEN e VEN-D ₆	78
Figura 16: Estrutura dos íons envolvidos nas transições MS/MS de ODV e NDV.....	78
Figura 17: Avaliação das extrações MISPE realizadas com os sorventes MIP4 e NIP4 de amostras de plasma branco enriquecidas com antidepressivos (60 ng mL ⁻¹). Estruturas químicas da (a) Venlafaxina; (b) Clorpromazina; (c) Fluoxetina; (d) Imipramina; (e) Clomipramina e (f) Sertralina, (g) Mirtazapina e (h) Paroxetina.....	80
Figura 18: Cromatogramas representativos do método MISPE/UPLC-MS/MS de amostra de plasma no LIQ e o respectivo branco de referência para VEN (tr = 2,48 min), ODV (tr = 1,26 min) e NDV (tr = 2,13 min) nas concentrações de 3, 5 e 3 ng mL ⁻¹ respectivamente.....	81
Figura 19: Avaliação da estabilidade dos analitos armazenados a 10°C no período de 1 a 6 dias. Estes ensaios foram realizados com amostras de plasma branco de referência enriquecidas com VEN, ODV e NDV na concentração de 700 ng mL ⁻¹	86

Lista de Tabelas

Tabela 1: Antidepressivos, metabólitos ativos, matriz biológica utilizada para monitorização da concentração do fármaco, intervalo terapêutico e concentrações que apresentam toxicidade de alguns antidepressivos comumente utilizados (adaptado ^{23,24})	25
Tabela 2: Métodos analíticos para determinação de VEN e ODV em amostras biológicas	28
Tabela 3: Métodos analíticos empregando a técnica MISPE para a determinação de compostos em fluidos biológicos	42
Tabela 4: Diferentes procedimentos avaliados para as sínteses dos polímeros pela via radicalar, por precipitação	57
Tabela 5: Procedimentos de síntese e taxa de recuperação para a venlafaxina	66
Tabela 6: Transições MS/MS (MRM) utilizadas para quantificação e qualificação, energia do cone (DP), energia de colisão (CE) e tempo de retenção (t _r) para cada um dos fármacos estudados e do padrão interno	77
Tabela 7: Faixa linear, coeficiente de determinação e limite de quantificação do método MISPE-LC-MS/MS para análise de VEN, ODV e NDV em amostras de plasma	83
Tabela 8: Precisão e exatidão interensaios do método MISPE-LC-MS/MS para determinação de VEN, ODV e NDV em amostra de plasma	84
Tabela 9: Valores de FMN para CQA e CQB de VEN, ODV e NDV	85
Tabela 10: Concentrações plasmáticas de VEN, ODV e NDV determinadas pelo método MISPE-LC-MS/MS miniaturizado 2 e 5 horas após a administração do medicamento	87
Tabela 11: Recentes métodos analíticos para determinação de VEN e ODV em amostras biológicas	92

Lista de siglas

ACN	Acetonitrila
AIBN	2,2-Azobisisobutironitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
API	(“ <i>atmospheric pressure ionization mass spectrometry</i> ”) Ionização a Pressão Atmosférica
APTMS	3-aminopropiltrimetoxisilano
C18	octadecilsilano
C2	dissilano
C8	octilsilano
CHCl ₃	Clorofórmio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CQA	Controle de Qualidade Alto
CQB	Controle de Qualidade Baixo
CQM	Controle de Qualidade Médio
CQD	Controle de qualidade de diluição
CV	Coeficiente de Variação
CYP2D6	Citocromo P450 2D6
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
EC-UV	Eletroforese capilar com detector de ultra violeta-visível
EGDMA	“Ethylene glycol dimethacrylate” - Dimetacrilado de Etileno Glicol
EPR	Erro Padrão Relativo
ESI	(“ <i>electrospray ionization</i> ”) ionização por eletrospray

FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FMN	Fator de Matriz Normalizado
FTIR	(<i>Fourier Transform. Infrared Spectrometry</i>)- Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
HCL	Ácido clorídrico
HPLC-FD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência
HPLC-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultra violeta-visível.
ISRSN	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
LLE	(<i>"Liquid-Liquid Extraction"</i>)- Extração líquido-líquido
LSQ	Limite Superior de Quantificação
MAA	(<i>"Methacrylic acid"</i>) - Ácido metacrílico
MDM	Metilenodioximetanfetamina
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MIP	(<i>Molecularly Imprinted Polymer</i>) – Polímero molecularmente impresso
MISPE	Extração em fase sólida com polímeros molecularmente impressos como fase sorvente
mmol	milimol
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
MS	(<i>mass spectrometry</i>)- Espectrometria de massas
NDV	N- desmetilvenlafaxina

NIP	(<i>“Non Imprinted Polymer”</i>) - Polímero não impresso
ODV	O-desmetilvenlafaxina
PI	Padrão Interno
SEM	(Scanning electron micrograph) – Microscopia eletrônica de varredura
SPE	(<i>“solid-phase extraction”</i>) - Extração em fase sólida
SRM	“selected reaction monitoring” – monitoramento de reações selecionadas
TBME	Terc Butil Metil Eter
TDM	(<i>“Therapeutic Drug Monitoring”</i>) – Monitorização terapêutica de fármacos
VEN	Venlafaxina

Lista de símbolos

k	fator de retenção
α	fator de separação
μL	microlitro
min	minuto
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
kV	kilovolt
λ	comprimento de onda
μm	micrômetro
μg	micrograma
mg	miligrama
mL	miliitros

Sumário

I.	INTRODUÇÃO.....	20
I.1.	VENLAFAXINA.....	21
I.2	MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA.....	23
I.3	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE VENLAFAXINA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	25
I.4	POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS.....	29
I.5	EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA COM FASE MOLECULARMENTE IMPRESSA (MISPE)	41
I.6	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (UPLC).....	44
I.7	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (LC-MS/MS)	47
II.	OBJETIVOS	51
III.	MATERIAIS E MÉTODO	53
III.1	REAGENTES E PADRÕES CROMATOGRÁFICOS	54
III.2	AMOSTRAS DE PLASMA.....	54
III.3	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DAS ANÁLISES REALIZADAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE FLUORESCÊNCIA (HPLC-FD).....	55
III.4	SÍNTESE DO POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESSO	55
III.5	REMOÇÃO DA MOLÉCULA MOLDE.....	57
III.6	CARACTERIZAÇÃO DO POLÍMERO	58
III.7	PRÉ-TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE PLASMA.....	58
III.8	OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS MISPE	58
III.9	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DAS ANÁLISES REALIZADAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (LC-MS/MS).....	60
III.10	VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO MISPE UPLC-MS/MS.....	61
IV.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
IV.1	SÍNTESE DO POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESSO	65
IV.2	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E QUÍMICA DOS MIPs.....	67
IV.3	OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO MISPE	71
IV.4	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMÉTRICAS	76
IV.5	SELETIVIDADE DO MIP	78
IV.6	VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO MISPE UPLC-MS/MS.....	81
IV.7	DETERMINAÇÃO DE VEN E SEUS PRINCIPAIS METABÓLITOS EM AMOSTRAS DE PACIENTES.....	86
IV.8	COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM OS DESCRITOS NA LITERATURA.....	88

VI. CONCLUSÕES	93
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

I. INTRODUÇÃO

I.1. VENLAFAXINA

A venlafaxina (VEN), em razão de sua eficácia e brandos efeitos adversos, tem sido um dos antidepressivos mais prescritos no tratamento da depressão e ansiedade. Junto com seu metabólito ativo O-desmetilvenlafaxina (ODV) são inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (ISRSN). Esses compostos possuem maior afinidade a sítios transportadores de monoamina, promovendo um aumento nos níveis de serotonina e noradrenalina. A potência da inibição de recaptação de serotonina é superior à de recaptação de noradrenalina, podendo ocorrer de forma distinta. Em doses elevadas, estas substâncias também podem atuar como inibidores da recaptação de dopamina. A venlafaxina e a ODV não apresentam afinidade por receptores alfa-1 adrenérgicos, receptores muscarínicos ou histamínicos e também não inibem a monoamino-oxidase. Diferente de outros antidepressivos, a VEN, após administrada em dose única, pode alterar a sensibilidade aos receptores beta adrenérgicos (BHALEKAR *et al.*, 2008; FEIGHNER, 1999; HENDSET *et al.*, 2006; HOLLIDAY; BENFIELD, 1995; HORST; PRESKORN, 1998) .¹⁻⁵

A principal via do metabolismo da VEN envolve o citocromo P450, originando a O-desmetilvenlafaxina (56%), N-Desmetilvenlafaxina (NDV- 1%) e Didesmetilvenlafaxina (DDV-16%). A ODV, principal metabólito, é formada por O-desmetilação pela isoenzima 2D6 do citocromo P450 (CYP2D6). Estudos *in vitro* evidenciam o envolvimento do CYP3A4 na metabolização da venlafaxina a N-desmetil-venlafaxina. A figura 1 mostra as estruturas da venlafaxina, ODV e NDV (KLAMERUS *et al.*, 1992). Pacientes que apresentam comprometimento hepático geram alterações no metabolismo da VEN. Assim doses ministradas

nesses pacientes devem ser reduzidas em até 50%, em casos mais graves (MORENO; MORENO; SOARES, 1999).

Figura 1: Estrutura Química da (a) Venlafaxina, (b) O-desmetilvenlafaxina, (c) N-desmetilvenlafaxina

A dose diária recomendada, para tratamento com VEN é de 75 a 225 mg por dia (TAKANO; HALLDIN; FARDE, 2013). A VEN pode ser ingerida junto com outros alimentos sem a ocorrência de comprometimento em sua absorção. Este fármaco apresenta rápida absorção, quando ingerido na ausência de outros alimentos e sua biodisponibilidade é de 45%. Sua formulação de liberação prolongada faz com que este fármaco seja liberado apenas por meio do controle de entrada e/ou saída através da membrana celular, impedindo que o pH do meio influencie no processo (HORST; PRESKORN, 1998).

Os efeitos adversos mais comumente observados em são: tonturas, náuseas, sonolência, diminuição da libido, anorgasmia, retardo ejaculatório e impotência. Pacientes sob tratamentos com doses diárias acima de 225 mg/dia podem apresentar hipertensão, tremores e sudorese abundante. Desta forma, a prescrição de VEN a pacientes que apresentam doenças cardiovasculares e hipertensão deve ser feita de maneira criteriosa, levando em consideração as doenças pré-existentes, de forma que não ocorra nenhum estímulo para elevação dos níveis de pressão arterial ou hipotensão postural. Estudos realizados em animais encontraram evidências específicas de que serotonina atua como morfogênio no desenvolvimento cardíaco e craniofacial (MOISEWITSCH, 2000; MOISEWITSCH; LAUDER, 1995; NEBIGIL *et al.*, 2000). Polen e colaboradores (POLEN *et al.*, 2013) associaram a ocorrência de diversos problemas de nascença, tais como cardiopatias, deficiência de septo e cranioestenose, em que a mãe foi submetida a tratamento com VEN no início da gravidez.

O intervalo terapêutico da VEN em plasma é de 100 a 500 ng mL⁻¹. Casos de intoxicação e de morte de pacientes que apresentaram concentrações plasmáticas de venlafaxina de 6600 a 84000 ng mL⁻¹ foram relatados na literatura (LEVINE *et al.*, 1996; MAZUR; DOTY; KRYGIEL, 2003).

I.2 MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA

A monitorização terapêutica (therapeutic drug monitoring, TDM) 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. A monitorização terapêutica através da determinação das concentrações plasmáticas auxilia no ajuste das doses dos fármacos prescritos na terapia. Pacientes com concentrações plasmáticas dos fármacos no intervalo terapêutico preconizado têm os efeitos adversos reduzidos e maior eficácia terapêutica. A aplicação da TDM se faz necessária devido às diferenças que cada indivíduo possui na absorção e metabolismo dos fármacos. As concentrações plasmáticas de determinado fármaco ministrado em um paciente podem variar de acordo com a composição genética, idade, condições de saúde, interação com outros fármacos, ingestão de álcool e alimentação.

A monitorização terapêutica tem sido aplicada a fármacos de baixo índice terapêutico, alta variabilidade interindividual na farmacocinética e resposta clínica não facilmente ou não imediatamente mensurável. A aplicação clínica da monitorização terapêutica tem sido também indicada em situações onde a eficácia do medicamento é questionada, quando o paciente exhibe toxicidade relacionada ao fármaco, quando há suspeita de não aderência do paciente ao regime de dosagem estabelecido, em situações de interações de fármacos, em patologias associadas capazes de alterar a disposição do fármaco, em situações de mudanças na formulação ou ainda quando a condição do paciente é refratária ao regime de dosagem convencional (BAUMANN *et al.*, 2004; DASGUPTA, 2008; HIEMKE *et al.*, 2011). A Tabela 1 ilustra os metabólitos ativos, matriz biológica utilizada na TDM, intervalos terapêuticos e concentrações tóxicas de alguns antidepressivos comumente utilizados.

Tabela 1: Antidepressivos, metabólitos ativos, matriz biológica utilizada para monitorização da concentração do fármaco, intervalo terapêutico e concentrações que apresentam toxicidade de alguns antidepressivos comumente utilizados (adaptado(FARHADI; HATAMI; MATIN, 2012; HERCEGOVA; DOMOTOROVA; MATISOVA, 2007)

Antidepressivo	Metabólito ativo	Matriz biológica	Intervalo Terapêutico (fármaco/met.) ng mL^{-1}	Concentrações tóxicas (fármaco/met.) ng mL^{-1}
Venlafaxina (LEVINE <i>et al.</i> , 1996; MAZUR <i>et al.</i> , 2003)	O-desmetilvenlafaxina	Soro ou Plasma	100-500 200-500	1000-1500
Amitriptilina (GRASMADER <i>et al.</i> , 2005)	Nortriptilina	Soro ou plasma	50-300 40-300	1500-2000 (L) 500 (soma)
Clomipramina (KIM <i>et al.</i> , 2002)	Desmetilclomipramina	soro	90-250	400 (soma)
Imipramina (RUWE <i>et al.</i> , 2001)	Desimipramina	soro	45-150 75-250	400-500
Sertralina (ZHU; NEIRINCK, 2002)	Desmetilsertralina	Soro ou plasma	30-200	290-1600
Paroxetina (GUNASEKARA; NOBLE; BENFIELD, 1998)	-	Soro	10-75	350-400

(L) = intervalo que pode ser letal. soma = concentração tóxica quando somada as concentrações individuais do antidepressivo e do metabólito ativo.

Os dados da Tabela mostram que em alguns casos o intervalo de concentração que apresenta toxicidade está próximo ao intervalo terapêutico do fármaco.

I.3 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE VENLAFAXINA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Em razão da complexidade dos fluidos biológicos, estes não são introduzidos em seu estado *in natura* em sistemas de cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas em tandem (*liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS), pois apresentam interferentes, principalmente as proteínas que podem (i) adsorver de forma irreversível junto à coluna analítica, modificando a retenção dos analitos, (ii) coeluir com os

analitos durante a separação cromatográfica ou (iii) suprimir a ionização dos analitos, durante processo de ionização à pressão atmosférica (API). Portanto, a etapa de preparo de amostras tem sido requerida no desenvolvimento de métodos analíticos, para eliminar os interferentes e pré-concentrar os analitos, quase sempre presentes em níveis de traços em amostras biológicas. O preparo da amostra é a etapa mais morosa de um procedimento analítico, consome cerca de 80% do tempo total de análise, além de ser uma possível fonte de erros, devido a perda dos analitos e contaminação da amostra (HERCEGOVA *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2008; PODHORNIAK; NEGRON; GRIFFITH, 2001; GUNASEKARA *et al.*, 1998).

As técnicas preparo de amostras, extração líquido-Líquido (*liquid-liquid extraction*, LLE) e extração em fase sólida (*solid phase extraction*, SPE) associadas, associadas a LC-MS/MS têm sido utilizadas no desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de VEN em diversas matrizes biológicas para fins de monitorização terapêutica ou estudos de farmacocinética, Tabela 2 (ARDAKANI; FOROUMADI; ROUINI, 2010; BERM *et al.*, 2014; DUTTA *et al.*, 2013; MADRAKIAN *et al.*, 2015; QIN *et al.*, 2010; REDDY *et al.*, 2013; SHAH *et al.*, 2009; SUENAGA *et al.*, 2009).

A técnica de LLE é baseada no equilíbrio de partição dos analitos entre duas fases imiscíveis para a extração e pré-concentração destas substâncias presentes na amostra. Geralmente, a técnica é aplicada em amostras aquosas, realizando a extração de analitos de baixa polaridade com uso de solventes apolares. A aplicação da técnica LLE tem como principal objetivo a separação dos analitos de interesse da maioria dos interferentes presentes na matriz

biológica o que contribui para seletividade da técnica de detecção (MINCZEWSKI *et al.*, 1982; ŻWIR-FERENC; BIZIUK, 2006).

A SPE é baseada nos mecanismos de adsorção, partição (fase normal e reversa), troca iônica e exclusão junto a uma fase sólida e vem sendo amplamente utilizada na extração de substâncias voláteis e não voláteis.

A SPE quando comparada à LLE (*i*) utiliza menor consumo de solvente orgânico, gerando volumes reduzidos de resíduos tóxicos, (*ii*) não apresenta emulsões entre as fases, (*iii*) fácil automação e (*iv*) sorventes mais seletivos para a concentração do analito.

No modo mais usual, quando o objetivo é isolar e/ou concentrar o(s) analito(s) de interesse, o procedimento SPE é realizado em quatro etapas: (1) condicionamento ou ativação do sorvente com solvente adequado, para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra; (2) introdução ou percolação da amostra, quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes; (3) limpeza da coluna para retirar os interferentes da matriz menos retidos que o analito, etapa esta conhecida como lavagem com solvente ou *clean-up* e 4) eluição e coleta do analito a amostra, dissolvida em um solvente apropriado. A fase sólida geralmente é empacotada no interior de um tubo semelhante a uma seringa de plástico, resultando num cartucho de SPE. A maioria dos sorventes disponíveis comercialmente baseia-se em grupos orgânicos como C18, C8, C2, cicloexil, fenil, cianopropil, aminopropil (NH₂), ligados quimicamente à sílica (PISSOLATTO; CARAMÃO; MARTINS, 1996; HERNANDEZ-BORGES *et al.*, 2007; NOVAKOVA; VLCKOVA, 2009).

A maioria dos métodos utilizados para a determinação de VEN (Tabela 2) não utiliza fase extratora seletiva e emprega grandes volumes de amostra biológica e de solventes orgânicos.

Tabela 2: Métodos analíticos para determinação de VEN e ODV em amostras biológicas

Matriz	Técnica de extração	Instrumento de análise	Linearidade (ng mL ⁻¹)	Referência
Urina	SPE: 50 µL de urina + 50mL tampão MeOH:HCL 2:1 (v/v) - eluição	Espectrofluorimetria	2-400	Madrakian <i>et al.</i> , 2014
Sangue	LLE ACN/MeOH, 1:3 (v/v)	LC-MS/MS	20-1000	Berm <i>et al.</i> , 2014
Plasma de Rato	LLE TBME	LC-MS/MS	10-8000	Gaurang <i>et al.</i> , 2014
Plasma humano	SPE 500 µL plasma + 1 mL de solução de amônia 2 mL of ACN (eluição)	LC-MS/MS	0.6-300	Dutta <i>et al.</i> , 2013
Plasma humano	LLE TBME/n Hexano 60:40 (v/v)	LC-MS/MS	0,1-300	Chandrapal <i>et al.</i> , 2013
Plasma humano	LLE: 200µL of plasma + 50 µL NaOH 1mL de acetato de etila (eluição)	LC-Fluorescência, λ Ex: 200 nm λ Em: 300 nm (1 ng mL ⁻¹)	1.0-300	Ardakani <i>et al.</i> , 2010
Plasma humano	LLE: 500 µL de plasma + 200 µL NaOH; 3mL de dietil éter (eluição)	LC-MS/MS (0.2 ng mL ⁻¹)	0.200-200	Qin <i>et al.</i> , 2010
Plasma de rato	LLE: 100 µL de plasma 1000 µL de TBME	LC-MS/MS (3.35 ng mL ⁻¹)	10 - 8000	Shah <i>et al.</i> , 2009
Plasma humano	LLE online C18: 100µL Plasma + 500uL ácido acético Fase móvel (eluição)	LC-MS/MS 0.25 ng mL ⁻¹)	0.25-200	Suenaga <i>et al.</i> , 2009

TBME = Metil Terc-butil éter; SPE = Extração em Fase Sólida; LLE = Extração Líquido-Líquido; LC-MS/MS = Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem; ACN = Acetonitrila; MeOH = metanol.

I.4 POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS

Polímeros molecularmente impressos (*Molecularly Imprinted Polymers*, MIP) são materiais sintéticos que apresentam interações com moléculas específicas. Esta especificidade é semelhante aos sistemas enzima-substrato, fármaco-receptor ou antígeno-anticorpo, ou seja, baseada em sistemas biomiméticos (YAN, H. Y.; ROW, 2006; MAYES; WHITCOMBE, 2005). As principais vantagens do uso dos MIP em relação aos imunosorventes são a estabilidade química, robustez, maior capacidade de adsorção, baixo custo, reprodutibilidade no preparo do polímero, não necessitam de condições especiais de armazenamento e de aprovação do projeto em comitê de ética, e podem ser aplicados a substâncias em que o elemento de reconhecimento biológico é desconhecido.

O uso de MIPs vem sendo aplicado em diferentes áreas da química, tais como sensores químicos, catalisadores, sensores de controles de liberação de fármacos e como sorventes seletivos para diversas técnicas de separação (MAYES; WHITCOMBE, 2005; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

De acordo com a literatura a maioria dos polímeros de impressão molecular são acrílicos ou acrilatos orgânicos, que são produzidos por reação radicalar. A síntese dos MIPs é realizada, basicamente, em três etapas (Figura 3):

- Formação de um complexo pré-polímero através de interações covalentes ou não covalentes entre os grupos funcionais da molécula molde (analito) e os grupos funcionais do monômero funcional;
- Etapa de polimerização em torno do complexo molde-monômero, gerando uma cadeia polimérica tridimensional altamente entrecruzada;
- Remoção da molécula molde das cavidades do polímero.

Após esta última etapa, são estabelecidas cavidades seletivas ao molde tanto em tamanho e forma, quanto à presença de grupos funcionais, formando-se, assim, os sítios específicos que atuam no reconhecimento do molde e/ou compostos com estrutura química semelhante à do analito. Após a realização das três etapas descritas, o material polimérico está apto a realizar a religação (sorção) seletiva da molécula utilizada como molde ou de compostos análogos (HAUPT; MOSBACH, 1999; PILETSKY; ALCOCK; TURNER, 2001).

Figura 2: Esquema geral para síntese dos MIP [adaptado (WULFF; SARHAN, 1972)].

Os processos de impressão molecular podem ser classificados como covalentes ou não covalentes, de acordo com as interações moleculares entre as moléculas dos monômeros funcionais da mistura de pré-polimerização e as moléculas do analito (molde para preparação). As interações de religação (sorção), que ocorrem durante a extração, do analito com o MIP também podem classificar os processos de impressão molecular (HAUPT; MOSBACH, 1999; PILETSKY *et al.*, 2001; WULFF; SARHAN, 1972).

Na abordagem molecular covalente a interação entre os grupos funcionais da molécula molde e do monômero funcional, durante a formação do complexo de pré-polimerização e na etapa de religação, é essencialmente covalente. Geralmente a ligação covalente ocorre por condensações reversíveis entre grupos funcionais da molécula molde e do monômero. A alta

estabilidade das ligações covalentes faz com que o complexo pré-polímero esteja menos susceptível a mudanças conformacionais durante a síntese, resultando em um polímero com sítos de ligação mais homogêneos e com interações não específicas minimizadas. No entanto, a abordagem molecular covalente apresenta como principais limitações a restrição a moléculas contendo grupos aldeídos, cetonas, aminas, alcoóis ou ácidos carboxílicos, lenta remoção do molde devido aos requisitos estéricos adicionais da hidrólise, cinética lenta durante a etapa de religação do analito e a necessidade de condições aquosas para realização da hidrólise. Além disso, após a remoção do molde, os sítos específicos de ligação podem fazer ligações covalentes irreversíveis, tornando-os inacessíveis para futuras religações (MAYES; WHITCOMBE, 2005; WULFF; SARHAN, 1972).

A abordagem molecular não covalente tem sido o procedimento mais utilizado. Nesta abordagem os grupos funcionais do monômero funcional e da molécula molde interagem de forma não covalente durante a etapa de formação do complexo de pré-polimerização e na etapa de religação. As interações não covalentes mais utilizadas para interação entre a molécula molde e o monômero funcional são as ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, π - π e hidrofóbicas. As principais vantagens da abordagem molecular não covalente são, a simplicidade no processo de síntese, maior número de monômeros funcionais disponíveis para aplicação e capacidade de interação com maior número de grupos funcionais presentes nas moléculas molde. Por outro lado a abordagem não covalente apresenta como principais desvantagens o baixo rendimento dos sítos específicos, a baixa estabilidade do complexo de pré polimerização que pode resultar em mudanças

conformacionais durante o processo de síntese e a maior chance de ocorrência de sítios de ligação não específicos, devido ao excesso de monômeros funcionais que são incorporados de forma randômica à crescente rede polimérica (WEI; MIZAIKOFF, 2007; ARSHADY; MOSBACH, 1981).

Os MIP podem ser sintetizados misturando-se a molécula molde, o monômero funcional, o iniciador radicalar, o solvente porogênico e o reagente reticulante em um meio reacional conveniente. A escolha de cada reagente deve ser feita de forma criteriosa, pois as características do produto final (superfície morfológica, densidade e tamanho de poros) são altamente dependentes das interações químicas entre suas moléculas (PICHON, 2007). Os monômeros funcionais são compostos orgânicos acrílicos ou vinílicos (síntese radicalar) ou alcoxisilano (precursor no processo sol-gel), que contém grupos funcionais que apresentam interações com grupos outros grupos funcionais presentes na molécula molde durante a polimerização (TARLEY *et al.*, 2005; YAN, H. Y.; ROW, 2006; MEHROTRA, 1990). A figura 3 ilustra alguns dos principais monômeros funcionais descritos na literatura.

O reagente reticulante gera uma estrutura altamente entrecruzada em torno do complexo molde-monômero, estabilizando os sítios de impressão molecular e favorecendo a estabilidade mecânica do polímero. A razão molar entre o reagente reticulante e os demais reagentes de síntese controla a morfologia da matriz polimérica. Razões elevadas do reticulante em relação ao monômero funcional e/ou solvente resultam em polímeros com maior permeabilidade e maior estabilidade mecânica (MAYES; WHITCOMBE, 2005; YAN, H. Y.; ROW, 2006; CORMACK; ELORZA, 2004). A figura 4 ilustra a estrutura dos reagentes reticulantes mais utilizados.

Figura 3: Estrutura química dos principais monômeros empregados no preparo de MIPs: (a) ácido metacrílico, (b) ácido p-vinilbenzóico, (c) ácido acrílico, (d) acrilamida, (e) 4-vinilpiridina, (f) 2-vinilpiridina e (g) 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS, precursor no processo sol-gel).

Figura 4: Reagentes reticulantes mais utilizados na síntese dos MIP via radicalar (a) p-divinilbenzeno e (b) etileno glicol dimetacrilato. Precursor geralmente utilizado em polimerizações via sol gel: (c) tetraetilortosilicato.

O solvente solubiliza os reagentes de sínteses, fazendo com que as interações entre a molécula molde, o monômero funcional e o reagente reticulante sejam completamente efetivas e favoráveis à formação de polímeros macroporosos (HAUPT; MOSBACH, 1999; PILETSKY *et al.*, 2001; WULFF; SARHAN, 1972). A natureza e o volume do solvente porogênico influencia as características morfológicas dos materiais poliméricos. Geralmente solventes apolares e polares apróticos são os mais empregados para polimerização radicalar (CORMACK; ELORZA, 2004).

Para que a polimerização tenha início, é necessário a inserção de um iniciador ao meio reacional (polimerização radicalar) para promover os primeiros radicais livres em solução ou um catalisador (polimerização por hidrólise e condensação) (PILETSKY *et al.*, 2001; WANG, D. X.; CHONG; MALIK, 1997; TAMAYO; TURIEL; MARTIN-ESTEBAN, 2007).

1.4.1 POLIMERIZAÇÃO RADICALAR

A polimerização radicalar, devido à sua versatilidade, eficiência e simplicidade operacional, está entre os métodos mais utilizados atualmente para síntese de polímeros molecularmente impressos. Devido a alta reatividade dos radicais livres formados no meio reacional, uma grande variedade de monômeros acrílicos ou vinílicos estão disponíveis comercialmente (a baixo custo), a síntese é realizada sob condições suaves de temperatura e pressão e a eficiência da polimerização é menos sensível à presença de impurezas presentes nos reagentes (ALEXANDER *et al.*, 2006; MOAD; SOLOMON; MOAD, 2006).

O mecanismo da polimerização radicalar ocorre basicamente em três etapas:

- **Início:** Ocorre a formação dos primeiros radicais livres em solução. Geralmente um iniciador radicalar é adicionado ao meio reacional sendo ativado por fotólise ou termólise. Os radicais gerados por decomposição das moléculas de iniciador são chamados de radicais primários. Esses radicais reagem pelo mecanismo de adição as duplas ligações carbono-carbono dos monômeros funcionais, formando as primeiras cadeias radicalares (radicais iniciadores). A conversão de radicais primários a radicais iniciadores, geralmente não é quantitativa, uma vez que os radicais primários podem sofrer rearranjo, fragmentação ou interação com solvente ou outros componentes do meio reacional, originando radicais secundários (MOAD *et al.*, 2006). No entanto, recentes publicações têm obtido excelentes resultados em sínteses de MIP, utilizando 1,1 azobis-(ciclohexanocarbonitrila), 2,2 azobisisobutironitrila 2,2-azobis-2-metilbutironitrila na presença de solventes como dimetilformamida, clorofórmio, acetonitrila e tolueno (ABDOUSS *et al.*, 2012; BASOZABAL *et al.*, 2013; LIAN; HE; WANG, 2014; LIU *et al.*, 2014; NUNEZ *et al.*, 2010). Na síntese do MIP, frequentemente utiliza-se uma quantidade molar de iniciador radicalar correspondente a 1% do numero total de mols de duplas polimerizáveis presentes no meio reacional.

- Propagação: A etapa de propagação é uma sequência de adições radiculares nas duplas ligações carbono-carbono dos monômeros funcionais, originando polímeros com alta massa molecular. Durante a síntese do MIP, o radical em propagação precisa apresentar seletividade em relação aos compostos presentes no meio reacional, reagindo apenas com os monômeros funcionais. Neste contexto, a escolha da molécula modelo e dos demais reagentes de síntese precisa ser realizada de forma criteriosa.
- Término: Existem dois mecanismos distintos que são responsáveis pelo fim das reações radiculares no meio reacional. O término da reação pode ocorrer por recombinação de dois macroradicais, originando uma macrocadeia polimérica ou por desproporcionamento, originando uma dupla ligação carbono-carbono e uma ligação simples carbono-hidrogênio no fim da cadeia (BOMPART; HAUPT, 2009; MOAD *et al.*, 2006). A figura 5 ilustra o mecanismo das etapas descritas.

Dentre as principais desvantagens da polimerização radicalar destacamos o uso de solventes orgânicos tóxicos e o não controle do tamanho, forma e número de macromoléculas sintetizadas. A dificuldade no controle dessas características se dá devido à alta reatividade dos radicais produzidos constantemente durante a polimerização. O aumento no número de radicais no meio reacional, além de favorecer o aumento da cadeia polimérica, também favorece as reações de terminação (recombinação e desproporcionamento), dificultando o controle do tamanho das cadeias. No entanto, diversos trabalhos relacionados à polimerização radicalar controlada têm sido publicados nos

últimos anos na tentativa de se obter melhor controle do tamanho das cadeias, do número de moléculas sintetizadas e da morfologia dos MIP (SALIAN; BYRNE, 2013; SASAKI *et al.*, 2015; WANG, H. S.; DONG; YANG, 2012; ZHANG, H., 2013).

Figura 5: Etapas da polimerização radicalar utilizada na síntese de MIP (a) Início: Radical primário ($R^\bullet$) reage com dupla ligação do monômero dando origem ao radical iniciador; (b) Propagação: radical iniciador reage com os monômeros funcionais no meio reacional; (c) Término: mecanismo de recombinação onde 2 macro radicais reagem originando uma macrocadeia polimérica (R_2 = cadeia composta por monômeros funcionais que foram incorporados na molécula durante a polimerização); (d) Término: mecanismo de desproporcionamento, onde o carbono radicalar interage com um centro eletrofílico (H), originando uma cadeia polimérica com instauração e outra com uma ligação simples C-H no fim da cadeia.

I.4.1.1 MÉTODOS DE PREPARO DOS MIP, VIA RADICALAR

A síntese de polímeros via radicalar pode ser realizada por diferentes métodos de preparo. Os métodos de preparo mais utilizados na síntese de polímeros molecularmente impressos são os de polimerização, em massa, por precipitação, multi etapas de swelling e em suspensão.

A técnica de polimerização em massa tem sido muito empregada na preparo de MIPs. Faz-se mistura dos reagentes de síntese em recipiente apropriado. Em seguida o recipiente é lacrado sob atmosfera de N₂, e a reação é iniciada utilizando luz UV ou calor. Após aproximadamente 20 horas, ocorrerá a formação de um monolito polimérico que requer moagem para resultar em partículas irregulares de 20-50 µm de diâmetro (SILVESTRI *et al.*, 2005; TAMAYO *et al.*, 2007). As principais vantagens da polimerização em massa são a simplicidade do processo de síntese e o fato de não requerer instrumentação sofisticada. Por outro lado o método apresenta como principais desvantagens a perda de sítos específicos durante o processo de moagem, trabalhoso processo de peneiramento que resulta em perda de 50-75% do produto obtido ao final da síntese e baixa eficiência de adsorção (YAN, H. Y.; ROW, 2006).

Na polimerização por suspensão a reação ocorre dentro de gotículas compostas pelos reagentes de síntese presentes em um solvente imiscível (geralmente a água). A técnica requer agitação constante e o uso de um estabilizador (geralmente um surfactante) para evitar a coagulação das gotas contendo os reagentes de síntese. Este método é rápido (reações que duram até duas horas), eficiente, e obtém partículas uniformes com tamanhos de 6 a

40 μm . A técnica apresenta como principal desvantagem a possível partição dos reagentes de síntese nas fases aquosa e orgânica, originando MIP com baixa eficiência de reconhecimento molecular. Agentes dispersantes podem ser utilizados para evitar a partição dos constituintes, no entanto apresentam elevado custo (SILVESTRI *et al.*, 2005; TAMAYO *et al.*, 2007; YAN, H. Y.; ROW, 2006).

Na polimerização por precipitação, as cadeias poliméricas crescem no meio reacional se tornando cada vez mais insolúveis com tendência a precipitação, gerando um polímero na forma de pó que não precisa ser peletizado. A polimerização por precipitação apresenta, como principais vantagens, a produção de partículas menores (ocasiona em maior área superficial), regulares e uniformes com tamanho que pode variar de 0,5 – 10 μm e alta eficiência, além da simplicidade do processo de síntese (SILVESTRI *et al.*, 2005; TAMAYO *et al.*, 2007).

A polimerização em multi-etapas, utiliza partículas poliméricas (chamadas de partículas semente) de tamanho bem definido em meio aquoso e com constante agitação, resultando em partículas com tamanho de até cinco vezes maior. Este processo tem sido pouco utilizado por ser um processo laborioso que exige várias etapas de síntese (gerando menor rendimento em relação à um processo com menor número de etapas) para obtenção do MIP (SILVESTRI *et al.*, 2005; TAMAYO *et al.*, 2007; YAN, H. Y.; ROW, 2006). A figura 6 abaixo ilustra os quatro procedimentos de síntese descritos.

Figura 6: Métodos mais utilizados para síntese de polímeros molecularmente impressos, (a) polimerização em massa, (b) polimerização por precipitação, (c) polimerização em suspensão e (d) polimerização em multi etapas (adaptado(PEREZ-MORAL; MAYES, 2004)).

I.5 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA COM FASE MOLECULARMENTE IMPRESSA (MISPE)

Os procedimentos clássicos de extração em fase sólida, embora apresentem vantagens quando comparados à LLE, ainda apresentam fases sólidas de baixa seletividade, longo tempo de extração e volumes de solventes e de amostras da ordem de mililitros. Na tentativa de aumentar a seletividade da técnica de extração em fase sólida, muitos trabalhos foram desenvolvidos utilizando MIP como fase sorvente (MISPE) (AHMADI; AHMADI; RAHIMI-NASRABADI, 2011; BENITO-PENA *et al.*, 2009; CARABIAS-MARTINEZ; RODRIGUEZ-GONZALO; HERRERO-HERNANDEZ, 2005; CLAUSEN; VISENTAINER; TARLEY, 2014; DU *et al.*, 2014; HARUN; ANDERSON; CORMACK, 2010; PEREIRA; RATH, 2009; PEREZ-MORAL; MAYES, 2004;

SONG, R. *et al.*, 2014; SONG, S. Q. *et al.*, 2008; YAN, H. *et al.*, 2014; ZHANG, X. *et al.*, 2015). A Tabela 3 abaixo mostra principais métodos analíticos empregados nos últimos anos para determinação de compostos em fluidos biológicos.

Tabela 3: Métodos analíticos empregando a técnica MISPE para a determinação de compostos em fluidos biológicos

Analitos	Matriz Biológica	Instrumentação de análise	Linearidade (ng mL⁻¹)	Referência
Bisfenol A	Urina	EC-UV	3-300	Xinfeng Z. <i>et al.</i> , 2015
Colesterol	Leite	HPLC-UV	0-250.10 ³	Clausen <i>et al.</i> , 2014
2-metoxiestradio	Plasma	HPLC-FD	60-20.10 ³	Bin D. <i>et al.</i> , 2014
Aciclovir	Urina	HPLC-UV	500-15.10 ³	Hongyuan. <i>et al.</i> , 2014
Glutathiona	Urina	HPLC-UV	500-200.10 ³	Renyuan S. <i>et al.</i> , 2014
Citalopram	Soro	HPLC-UV	1-100	Abdous M. <i>et al.</i> , 2012
	Urina		2-120	
3,4-MDM	Plasma	HPLC-UV	3,6-11500	Farhad A. <i>et al.</i> , 2011 ⁷⁹
Cetamina	Cabelo	LC-MS/MS	0,1-10 (ng mg ⁻¹)	Norlida H. <i>et al.</i> , 2010
norcetamina			0,2-10 (ng mg ⁻¹)	
Clorpromazina	Urina	HPLC-UV	200-2010 ³	Suquan <i>et al.</i> , 2008

EC = Eletroforese capilar; HPLC-UV = Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV-VIS MDM = Metilenodioximetanfetamina

Com o objetivo de minimizar os volumes de solventes orgânicos e de amostras biológicas, muitos autores têm substituído o cartucho convencional de SPE por microdiscos que podem ser acoplados ao sistema a vácuo, denominando SPE miniaturizado. Neste sistema, a massa de fase estacionária utilizada é da ordem de dezenas de miligramas, enquanto que os volumes de solventes e de amostra são da ordem de centenas de microlitros. A Técnica SPE miniaturizada têm sido aplicada com êxito na determinação de parabenos em amostras de leite materno (MELO; QUEIROZ, 2013), aciclovir em urina (YAN, H. *et al.*, 2014) e fluoxetina e norfluoxetina em soro (LI; THOMPSON; MCGREGOR, 2004), utilizando diferentes tipos de sorventes . A figura 7 ilustra o sistema de extração em fase sólida miniaturizado com filtros de microseringa.

Figura 7: Sistema SPE miniaturizado com filtros de microseringa de polipropileno com membrana de celulose regenerada.

Desta forma, a técnica SPE miniaturizada se apresenta como uma alternativa promissora para a determinação de fármacos em fluidos biológicos, pois além de manter a simplicidade, robustez e eficiência da SPE convencional, permite o emprego de menor massa de diferentes fases extratoras seletivas (LI *et al.*, 2004; MELO; QUEIROZ, 2013; YAN, H. *et al.*, 2014).

O procedimento de MISPE miniaturizado é análogo ao método clássico de SPE. No entanto, devido a menor massa de fase estacionária, os microfiltros recheados com MIP têm sido reutilizados por até 90 vezes (BENITO-PENA *et al.*, 2009) sem perda significativa da eficiência de extração. A fase estacionária pode ser reutilizada, após etapa de *clean up*, inter ensaios, minimizando o efeito memória.

I.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (UHPLC)

A cromatografia líquida é uma técnica de separação dos componentes de uma mistura. Trata-se de um método físico-químico de separação, onde uma fase móvel percola por uma fase estacionária. A separação ocorre por partição dos componentes da mistura entre as fases de forma que, com a passagem da fase móvel, cada componente é sorvido seletivamente na fase estacionária. O resultado é a migração de cada componente com uma velocidade característica (FISCHER, 2006; MALDANER; JARDIM, 2009).

A busca pelo aumento da eficiência na separação, maior frequência analítica e redução do tempo das análises, resultou no desenvolvimento de novas fases estacionárias, originando colunas mais seletivas, eficientes e estáveis. A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC) tem sido a técnica mais utilizada no emprego de métodos cromatográficos em

diversos campos das ciências e até em órgãos governamentais. No entanto, a busca por maior eficiência das análises ainda tem sido requerida. Parâmetros como comprimento da coluna, vazão, temperatura e tamanho de partículas tem sido avaliados (FISCHER, 2006; MALDANER; JARDIM, 2009).

A diminuição do diâmetro das partículas (d_p) comumente utilizadas em HPLC ($d_p > 2\mu\text{m}$), além de resultar em aumento na eficiência, permite o aumento da velocidade linear (velocidade em que a fase móvel percola a coluna cromatográfica) e da vazão da fase móvel (SWARTZ, 2005). No entanto, com o uso de partículas com diâmetros menores que $2\mu\text{m}$, o desempenho cromatográfico fica limitado pela pressão, uma vez que os sistemas de HPLC não suportam o aumento de pressão que estas colunas ocasionam. Desta forma se faz necessário a utilização de uma instrumentação adequada, capaz operar em altos valores de pressão. Neste contexto, a cromatografia líquida de ultra eficiência foi desenvolvida para uso de colunas analíticas recheadas com partículas menores que $2\mu\text{m}$ (MALDANER; JARDIM, 2012; MALDANER; JARDIM, 2009; SWARTZ, 2005).

A relação entre tamanho de partículas e a eficiência cromatográfica pode ser explicada pela equação de Van Deemter, utilizada na investigação do desempenho cromatográfico em função da altura (H) do prato teórico. Um prato teórico pode ser considerado como uma etapa de equilíbrio de partição entre a fase estacionária e a fase móvel. É sabido que quanto menor a altura do prato, maior a eficiência da coluna (RIBANI *et al.*, 2004).

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (1)$$

Onde μ = Coeficiente de difusão do analito ou velocidade linear da fase móvel e A,B e C são constantes. O parâmetro A está relacionado aos caminhos múltiplos que as moléculas do analito podem percorrer durante a separação cromatográfica. A diminuição deste parâmetro pode ser realizada com a utilização de colunas de comprimento reduzido, com diâmetro interno menor, empacotamento eficiente e partículas uniformes. O termo B está relacionado à difusão do soluto na fase móvel e pode ser minimizado pelo aumento da velocidade linear da fase móvel. O termo C está relacionado à transferência de massa do analito entre a fase móvel e a fase estacionária. A plotagem da curva de Van Deemter permite determinar a vazão ótima para se obter a maior eficiência, uma vez que o mínimo da curva representa a vazão ideal para eficiência máxima. Partículas menores diminuem a altura do prato, aumentando o número de pratos teóricos de uma coluna e conseqüentemente sua eficiência.

A cromatografia líquida de ultra eficiência utiliza fases estacionárias compostas de partículas menores que 2 μm . A principal vantagem do uso de partículas deste tamanho é que o comprimento da coluna pode ser reduzido sem perda significativa da eficiência, resultando numa diminuição do tempo de separação, uma vez que o tempo de separação é proporcional ao comprimento da coluna (MALDANER; JARDIM, 2012; RIBANI *et al.*, 2004; SWARTZ, 2005).

O aumento no número de pratos teóricos, além de aumentar a eficiência, aumenta a resolução cromatográfica. A equação da resolução cromatográfica (R_s), equação 2, abaixo ilustra este fato:

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4}\right) \left(\frac{k}{k+1}\right) \left(\frac{\alpha+1}{\alpha}\right)$$

(2)

Onde N = número de pratos teóricos

k = fator de retenção

α = fator de separação

A tecnologia de UPLC utiliza os princípios cromatográficos ao máximo para realizar as separações com resolução superior e alta detectabilidade. Desta forma, podemos destacar as principais vantagens da UHPLC, frente a HPLC: aumento da resolução; diminuição no tempo de análise, melhor detecção; redução no consumo de fase móvel, menor volume de amostra para injeção e menores diâmetros de partículas de novas fases estacionárias (HUBICKA *et al.*, 2013; MALDANER; JARDIM, 2012).

I.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (LC-MS/MS)

Segundo a definição da IUPAC a espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) é o estudo da matéria pela obtenção de íons em fase gasosa e posteriormente caracterizados pela massa, carga, estrutura ou propriedades físico-químicas (MURRAY *et al.*, 2005).

Atualmente a ionização por electrospray (ESI) tem sido a técnica mais utilizada quando a cromatografia líquida esta acoplada à espectrometria de massas, permitindo assim, a ionização de compostos à pressão atmosférica. Para ionização dos compostos, a amostra é dissolvida em um solvente

apropriado e pressurizada em um tubo capilar de aço inox. A aplicação de uma voltagem no capilar, geralmente entre 3 e 5 kV, faz com que os compostos da amostra sejam ionizados, gerando um aerossol que emerge do capilar. As gotículas de aerossol sofrem dessolvatação e os íons são atraídos para o analisador de massas induzidos por interações eletrostáticas e pelo vácuo. A ESI pode ser aplicada no modo positivo ou negativo para analitos que formam cátions ou ânions respectivamente, durante o processo de ionização. A energia utilizada para ionização por electrospray não é suficiente para gerar fragmentações na molécula. Desta forma, a ESI gera íons protonados $[M+H]^+$ e íons desprotonados $[M-H]^-$ no modo positivo e negativo respectivamente (PETROVIC *et al.*, 2005; LANÇAS, 2009; WEBB *et al.*, 2004).

O analisador de massas seleciona os íons formados de acordo com a razão m/z . Análises quantitativas de substâncias em nível de traços em matrizes complexas requerem alta sensibilidade e seletividade. O analisador de massas quadrupolar vem sendo muito utilizado em trabalhos que envolvem quantificações de compostos em matrizes complexas. Este analisador é constituído por 4 hastes posicionadas em pares, onde hastes opostas são conectadas eletricamente, sendo aplicada entre elas, uma voltagem fora de fase. Desta forma íons com diferentes m/z apresentarão trajetórias diferentes e os íons focalizados (íons de interesse) serão direcionados para o detector (LANÇAS, 2009).(LANÇAS, 2009; VESSECCHI *et al.*, 2011)

O aumento na seletividade e sensibilidade pode ser obtido por fragmentação do íon dentro de uma célula de colisão ou até mesmo do próprio analisador. Esse tipo de conformação é denominado espectrometria de massas em tandem (MS/MS) pois utiliza duas etapas de espectrometria de massas

onde a primeira etapa é utilizada para selecionar o íon de interesse. A segunda etapa relaciona o íon de interesse com outros íons gerados a partir de sua fragmentação.

Espectrometria de massas em tandem pode ser realizada com alta sensibilidade e seletividade utilizando analisadores de massas do tipo quadrupolar. Este tipo de analisador é constituído por dois analisadores quadrupolares e uma câmara de colisão em série. A câmara de colisão é posicionada entre os dois quadrupolos. O primeiro quadrupolo é responsável pela seleção do íon precursor (íon pai). A câmara de colisão, além de ser responsável pela colisão do íon pai selecionado com um gás inerte, seleciona o fragmento de interesse (íon filho) pela razão m/z . O terceiro quadrupolo é responsável pela seleção de um ou mais íons filhos de acordo com a razão m/z selecionada. O monitoramento de vários íons precursores é chamado de “monitoramento de reações múltiplas” (MRM) ou “monitoramento de reações selecionadas” (SRM, do inglês *selected reaction monitoring*) (LANÇAS, 2009; VESSECCHI *et al.*, 2011).

O acoplamento entre a cromatografia e a espectrometria de massas associa a seletividade da técnica cromatográfica com a alta sensibilidade, informação estrutural e seletividade adicional da espectrometria de massas, dando origem a uma técnica com alto poder analítico. A interface entre os instrumentos requer adaptações que não comprometam as modificações químicas do soluto e não ocasionem em perda da amostra. O espectro de massas representa a intensidade do íon (positivo ou negativo) detectado em função de sua razão massa/carga (m/z). O estudo da fragmentação fornece informações qualitativas dos analitos, possibilitando a identificação e

elucidação estrutural com base na razão m/z de cada fragmento. A grande sensibilidade da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas dissemina suas aplicações a análise de compostos em níveis de traço em diferentes matrizes (WEBB *et al.*, 2004; MALDANER; JARDIM, 2009; LANÇAS, 2009).

A aplicação da técnica de LC-MS/MS não requer separação cromatográfica dos analitos devido à detecção seletiva da espectrometria de massas em tandem. No entanto a separação cromatográfica dos analitos aumenta a detectabilidade da técnica e reduz o efeitos de supressão iônica (PETROVIC *et al.*, 2005).

II. OBJETIVOS

II.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Desenvolvimento e validação do método MISPE-UPLC-MS/MS miniaturizado para determinação de VEN e seus principais metabólitos em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica.

II.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Desenvolvimento e caracterização do polímero molecularmente impresso, utilizando a VEN como molécula molde.
- Otimização das condições MISPE miniaturizado para a extração de VEN e seus principais metabólitos em amostras de plasma.
- Otimização das condições UPLC-MS/MS para a determinação de VEN e seus principais metabólitos em amostras de plasma
- Validação do método MISPE-UPLC-MS/MS miniaturizado para determinação de VEN e seus principais metabólitos em amostras de plasma.
- Análise de amostras de pacientes em terapia com VEN para fins de monitorização terapêutica.

III. MATERIAIS E MÉTODO

III.1 REAGENTES E PADRÕES CROMATOGRÁFICOS

Os padrões cromatográficos de VEN, ODV, NDV, o padrão interno, marcado isotopicamente, a VEN D₆, Etileno Glicol Dimetacrilato (EGDMA), 2,2'-azobisisobutironitrila (AIBN) e Ácido metacrílico foram adquiridos da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil). Através de diluições das soluções estoque (100 µg mL⁻¹), em metanol, foram preparadas as soluções de trabalho (1 µg mL⁻¹). Estas soluções padrões demonstraram-se estáveis sob condições de armazenamento (-20°C) por 8 meses, e à temperatura ambiente (22°C) no período das análises. A água ultrapura utilizada foi previamente purificada em sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brasil). Metanol, ácido acético, acetonitrila (grau HPLC), acetato de sódio, borato de sódio e fosfato de sódio foram adquiridos da JT Backer (Phillipsburg, EUA). A fase móvel foi filtrada em sistema de filtração a vácuo com membrana de 0,45 µm de celulose regenerada e Microdiscos de celulose regenerada com tamanho de poro de 0,45 µm e 4 mm de diâmetro foram adquiridos da Millipore (São Paulo, Brasil). O processo de filtração foi feito sob agitação, resultando na degaseificação da fase móvel.

No procedimento de extração em fase sólida miniaturizado, desenvolvido no presente trabalho, foram utilizados microfiltros de 0,5 cm de diâmetro, com membrana de 0,45 µm de diâmetro de poro composto por celulose regenerada adquiridos da Sartorius Stedim (São Bernardo do Campo-SP, Brasil).

III.2 AMOSTRAS DE PLASMA

As amostras de plasma branco de referência, com sorologia negativa para hepatite B e C, HIV, chagas, HTLV I/II, TGP e sífilis, foram cedidas pelo

HCFMRP – USP, as quais foram enriquecidas com os analitos em diferentes concentrações para a otimização das variáveis MISPE miniaturizado, das condições cromatográficas (LC-MS/MS) e validação analítica do método desenvolvido.

As amostras de plasma de paciente em terapia com venlafaxina foram cedidas pelo Laboratório de Toxicologia da FCFRP-USP, sob coordenação da Profa. Dra. Regina Helena Costa Queiroz. Estes pacientes encontram-se em terapia com venlafaxina por mais de 02 anos e administram a dose de 150 mg/dia Efexor[®].

III.3 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DAS ANÁLISES REALIZADAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE FLUORESCÊNCIA (HPLC-FD)

As análises para avaliar os procedimentos de síntese dos polímeros foram realizadas em cromatógrafo a líquido da Varian 230 ProStar (Varian, California, USA) equipado com sistema de controle CBM-20A e detector de fluorescência (Shimadzu RF-10 AXL). Venlafaxina e metabólitos foram analisados em coluna de fase reversa RP 18 LichroCART[®] (125 mm x 4 mm x 5 m particle size – Merck, Darmstadt, Germany) a temperatura de 25°C. A fase móvel é composta por uma mistura de ACN e tampão acetato pH = 4,5 (50:50 v/v) em modo isocrático com vazão de 0,8 mL min⁻¹. O eluente da coluna foi monitorado em 230 nm (excitação) e 290 nm (emissão).

III.4 SÍNTESE DO POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESSO

O processo de síntese selecionado para impressão do MIP neste trabalho foi o de polimerização radicalar por precipitação, devido à sua

simplicidade e alta eficácia (PEREZ-MORAL; MAYES, 2004; YE; CORMACK; MOSBACH, 1999). Uma mistura de VEN (molécula modelo) e ácido metacrílico (MAA, monômero funcional) em diferentes solventes (porogênicos) foi mantida sob agitação a temperatura de 25°C por 5 horas para formação de um complexo entre VEN e MAA. Em seguida, etileno glicol dimetacrilado (EGDMA, reagente reticulante) e 2,2-azobisisobutironitrila (AIBN, iniciador radicalar) foram adicionados. O tubo foi sonicado, selado sob atmosfera de N₂ e colocado em banho a 60°C por 22 horas. O material resultante foi separado por filtração e lavado com metanol.

A Tabela 4 ilustra a composição dos reagentes e concentrações molares dos diferentes procedimentos de síntese avaliados para a obtenção de adequadas taxas de extração dos fármacos. Utilizou-se a razão molar 12:1 entre o monômero funcional e o reagente reticulante (MAA:EGDMA), para obtenção de um polímero com rigidez adequada e alto grau de reticulação (ABDOUSS *et al.*, 2012).

O polímero não impresso (NIP), utilizado para avaliar a seletividade do MIP, foi sintetizado segundo os procedimentos delineados para o MIP, porém sem adição de VEN.

Tabela 4: Diferentes procedimentos avaliados para as sínteses dos polímeros pela via radicalar, por precipitação

Procedimento	MIP	VEN:MAA (mmol)	EGDMA:MAA (mmol)	MAA (mmol)	Solvente	EGDMA (mmol)
1	MIP ₁	1:5	12:1	0,2	ACN	2,4
	NIP ₁	-	12:1	0,2	ACN	2,4
2	MIP ₂	1:5	12:1	0,2	CHCl ₃	2,4
	NIP ₂	-	12:1	0,2	CHCl ₃	2,4
3	MIP ₃	1:5	12:1	0,2	Tolueno	2,4
	NIP ₃	-	12:1	0,2	Tolueno	2,4
4	MIP ₄	1:4	12:1	0,16	Tolueno	1,92
	NIP ₄	-	12:1	0,16	Tolueno	1,92
5	MIP ₅	1:3	12:1	0,12	Tolueno	1,44
	NIP ₅	-	12:1	0,12	Tolueno	1,44

MIP = polímero molecularmente impresso; NIP = polímero não impresso; ACN = acetonitrila; CHCl₃= clorofórmio; VEN= venlafaxina; MAA = ácido metacrílico; EGDMA = etileno glicol dimetacrilato

III.5 REMOÇÃO DA MOLÉCULA MOLDE

Para a remoção da molécula molde das cavidades específicas do MIP, o polímero foi lavado em solução de ácido acético 1% em metanol, primeiro em sistema soxhlet por 4 dias e em seguida em banho de ultrassom. A remoção da molécula molde foi avaliada pela análise da solução de lavagem por HPLC-FD.

III.6 CARACTERIZAÇÃO DO POLÍMERO

A caracterização dos polímeros avaliados neste trabalho foi realizada com o objetivo de elucidar alguns aspectos estruturais, físicos e químicos, dos materiais sorventes resultantes.

A caracterização física foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Zeiss EVO 50, Cambridge-UK), potencial de aceleração de 20 kV com Sputter Coater Bal-Tec SCD 050 para MIP₁, MIP₄ e NIP₄, magnitude de 10 kx, tempo de spray de 150s e resolução nominal de 1 μm .

A caracterização química foi realizada por microscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). O espectro de FTIR (ABB Bomem series MB100) foi realizado de 400 a 4000 cm^{-1} utilizando pastilha de KBr e coletado um ponto a cada 2 cm^{-1} e 32 varreduras.

III.7 PRÉ-TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE PLASMA

Inicialmente, as proteínas das amostras de plasma (200 μL) foram precipitadas com acetonitrila (1:2 v/v). Este procedimento foi realizado sob agitação em vortex e posterior centrifugação por 30 min a 9000 g. O sobrenadante (500 μL) foi transferido para um tubo eppendorf e submetido a secagem sob vácuo. O extrato seco foi reconstituído em 300 μL de solução tampão para aplicação do procedimento MISPE.

III.8 OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS MISPE

A otimização das variáveis MISPE foi realizada em triplicata, com amostras de plasma (branco de referência) enriquecidas com VEN, ODV, NDV e VEN D₆ na concentração de 50 ng mL^{-1} . Microdiscos de celulose regenerada

com tamanho de poro de 0,45 μm e 4 mm de diâmetro recheados com 8 mg de fase molecularmente impressa foram utilizados como dispositivo para SPE miniaturizado. Inicialmente, os microdiscos foram condicionados com 100 μL de metanol (MeOH) seguidos da adição de 100 μL de água ultrapura.

O efeito do pH da amostra na eficiência da extração foi a primeira variável a ser otimizada. Os extratos secos, após o procedimento de precipitação das proteínas das amostras de plasma, foram reconstituídos em 300 μL de solução tampão em três valores diferentes de pH (tampão fosfato pH 8 e 11 e tampão borato pH 10). Acetonitrila (ACN) e tolueno também foram avaliados como solventes para reconstituir o extrato seco.

Antes do procedimento de dessorção dos analitos, 200 μL de solução de ácido acético (0,1%), seguido de 100 μL de solução metanol: água (10:90 v/v) foram percolados pelo sorvente para a remoção dos componentes endógenos da matriz biológica.

Em seguida, metanol e acetonitrila em diferentes volumes (200 a 700 μL) foram avaliados como solventes para a eluição (dessorção) dos analitos.

Para otimização da etapa de lavagem do sorvente, para posterior reutilização, as soluções de MeOH/ACN (50:50 v/v) e MeOH/H₂O (50:50 v/v) foram avaliadas em volumes de 200 a 500 μL . As frações eluídas foram secas e reconstituídas em fase móvel. Uma alíquota de 5 μL foi injetada no sistema UPLC-MS/MS para a avaliação da eficiência de limpeza.

III.9 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DAS ANÁLISES REALIZADAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (LC-MS/MS)

As análises para a otimização das variáveis MISPE e validação analítica do método foram realizadas em cromatógrafo a líquido de ultra eficiência ACQUITY UPLC (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) acoplado a espectrômetro de massas em Tandem da Waters XEVO TQD (triplo quadrupolo) com ionização por eletrospray (ESI). A separação cromatográfica foi realizada em coluna Kinetex C18 100A column (1.7 μm x 100 x 2.1 mm) a 40°C. Utilizou-se o modo de eluição por gradiente sendo acetato de amônio 30 mmol L⁻¹ pH 8 como fase móvel A e ACN como fase móvel B, vazão de 0,3 mL.min⁻¹. A composição da fase móvel durante o gradiente foi: 30% B (2,5 – 3,0 min), 30-80% B (gradiente linear de 3,0 – 3,5 min), 70-30% B (gradiente linear de 3,5 – 6,0 min). Os parâmetros otimizados do espectrômetro de massas foram: voltagem do capilar, 0,50 kV; temperatura da fonte, 150 °C; temperatura de dessolvatação, 600 °C; fluxo do gás de dessolvatação, 600 L h⁻¹ (N₂, 99.9% de pureza); fluxo do cone de gás, 20 L h⁻¹. Venlafaxina e seus metabolitos foram analisados por monitoramento de reações múltiplas (MRM), utilizando argônio (99,9999% de pureza) como gás de colisão para obtenção dos íons-filho, que foram selecionados de acordo com a intensidade do sinal de cada fragmento, durante o processo de otimização. Os dados foram adquiridos utilizando o software MassLynx V4.1. O software QuanLynx foi utilizado para o processamento de dados e quantificação. Duas transições específicas foram otimizadas para cada composto, a fim de se obter maior seletividade e confiabilidade no método. A primeira transição (sinal de maior intensidade) foi utilizada para quantificação do composto, a segunda para análise qualitativa.

III.10 VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO MISPE UPLC-MS/MS

Os parâmetros de validação analítica (seletividade, linearidade, limite de quantificação, precisão e exatidão) do método MISPE/UPLC-MS/MS foram avaliados segundo a resolução RDC Nº 27, DE 17 DE MAIO DE 2012, da ANVISA, (ANVISA, 2012) que “*dispõe sobre requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos*”.

A seletividade foi avaliada pela comparação dos cromatogramas de amostras de branco de referência de seis diferentes procedências e destas amostras enriquecidas com VEN, ODV e NDV em concentrações que representam os limites de quantificação.

A linearidade foi avaliada por meio de curvas analíticas com aplicação do método dos mínimos quadrados (RAWLINGS; PANTULA; DICKEY, 1998). As curvas analíticas foram plotadas pela razão da área do analito (VEN, ODV e NDV) sobre área do PI (eixo das ordenadas) em função das concentrações nominais dos analitos em ng mL^{-1} (eixo das abscissas). O intervalo de concentração foi considerado linear quando o coeficiente de variação (CV), apresentou-se menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o limite inferior de quantificação (LIQ), e menor do que 15% em relação à concentração nominal para os outros calibradores, incluindo o limite superior de quantificação (LSQ). O intervalo terapêutico da venlafaxina foi considerado na avaliação da linearidade do método. As menores concentrações das curvas analíticas correspondem aos limites inferiores de quantificação.

A precisão foi determinada em ensaios realizados em três dias consecutivos (precisão interensaio). Cada experimento foi realizado em

quintuplicata em cinco diferentes concentrações denominadas LIQ, controle de qualidade baixo (CQB), controle de qualidade médio (CQM) e controle de qualidade alto (CQA) e LSQ. Os valores de CV não devem exceder em 15% para os controles de qualidade, exceto para o LIQ que não deve exceder em 20%.

A exatidão foi determinada em ensaios realizados em um mesmo dia (exatidão intraensaio) e em três dias consecutivos (exatidão interensaio). Cada experimento foi realizado em quintuplicata em cinco diferentes concentrações (LIQ, CQB, CQM, CQA e LSQ). Para avaliar a exatidão, expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), não foram admitidos valores fora da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitiu valores fora da faixa de $\pm 20\%$ (vinte por cento) do valor nominal.

$$EPR = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}) \times 100}{\text{Valor nominal}} \quad \text{Eq. 1}$$

A avaliação do efeito residual foi realizada, no mínimo, com 3 (três) injeções de amostras de branco referência, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma ou mais amostras correspondentes ao LSQ. Os picos interferentes, nos tempos de retenção dos analitos, devem possuir valores de áreas inferiores a 20% (vinte por cento) das áreas dos analitos nos LIQ e inferiores a 5% da área do PI.

O efeito de matriz foi avaliado comparando as respostas analíticas dos analitos em solução padrão aquosa com as respostas dos analitos em amostras de plasma (oito diferentes procedências) enriquecidas na concentração do CQB e CQA. Para cada concentração do CQB e CQA

calculou-se o efeito de matriz normalizado por padrão interno (PI) (FMN), *Equação 2*, o qual deve apresentar valores de CV inferiores a 15% para todos os analitos.

$$FMN = \frac{\text{Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução}} \quad \text{Eq. 2}$$

Para avaliar a estabilidade dos analitos após procedimento MISPE, amostras de plasma branco de referência foram enriquecidas com VEN, ODV e NDV na concentração de 700 ng mL⁻¹. Após o procedimento de extração (MISPE), o extrato obtido foi armazenado a 10°C durante 1, 3 e 6 dias. Uma alíquota de 5 µL foi injetada no sistema LC-MS/MS após cada período. Estes ensaios foram realizados, para tornar possível o armazenamento dos extratos obtidos e análise de um número maior de amostras em um dia de trabalho, pois o UPLC-MS/MS utilizado possui injetor automático.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 SÍNTESE DO POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESSO

Dentre os procedimentos de síntese avaliados, (Tabela 5) o MIP₄ (VEM:MAA 1:4 mmol, EGDMA:MAA: 12:1 mmol, MAA: 0,16 mmol, tolueno, EGDMA:1,92 mmol) apresentou maior taxa de recuperação para venlafaxina ($84,1 \pm 3,35$) quando comparado com o NIP4 ($49,9 \pm 2,79$), demonstrando alta especificidade do sorvente e adequada permeabilidade para a percolação da amostra. Estes ensaios de SPE miniaturizado foram realizados com solução tampão fosfato pH 8,0, enriquecida com venlafaxina na concentração de 60 ng mL⁻¹.

Durante a polimerização, as crescentes cadeias poliméricas se tornam cada vez mais insolúveis no meio reacional, resultando na precipitação de aglomerados poliméricos. O polímero resultante é obtido na forma de pó o qual não precisa ser peletizado.

O ácido metacrílico foi escolhido como monômero funcional, pois possui grupos funcionais que interagem em tamanho e em forma complementar, por meio de ligações de hidrogênio com os grupos funcionais presentes na VEN. Baixas concentrações de monômero funcional, em relação à molécula molde, podem causar problemas por insuficiência de monômeros para formação do complexo MAA-VEN e assim, diminuir a quantidade de sítios específicos no polímero final. Por outro lado, o excesso de monômeros funcionais é incorporado de forma randômica na cadeia polimérica, interagindo de forma não específica com os compostos endógenos da amostra biológica, durante o procedimento de extração e podendo, assim, coextrair tais compostos (RACHKOV; MINOURA, 2000).

Tabela 5: Procedimentos de síntese e taxa de recuperação para a venlafaxina

Proc.	MIP	VEN:MAA (mmol)	EGDMA:MAA (mmol)	MAA (mmol)	Solvente	EGDMA (mmol)	Recuperação pH 8
1	MIP ₁	1:5	12:1	0,2	ACN	2,4	67,4 ± 1,9
	NIP ₁	-	12:1	0,2	ACN	2,4	67,6 ± 4,9
2	MIP ₂	1:5	12:1	0,2	CHCl ₃	2,4	78,7 ± 1,8
	NIP ₂	-	12:1	0,2	CHCl ₃	2,4	67,4 ± 1,0
3	MIP ₃	1:5	12:1	0,2	Tolueno	2,4	77,22 ± 1,4
	NIP ₃	-	12:1	0,2	Tolueno	2,4	62,2 ± 1,4
4	MIP ₄	1:4	12:1	0,16	Tolueno	1,92	84,1 ± 3,3
	NIP ₄	-	12:1	0,16	Tolueno	1,92	49,9 ± 2,8
5	MIP ₅	1:3	12:1	0,12	Tolueno	1,44	72,4 ± 3,0
	NIP ₅	-	12:1	0,12	Tolueno	1,44	51,5 ± 2,9

MIP = polímero molecularmente impresso; NIP = polímero não impresso; ACN = acetonitrila; CHCl₃ = clorofórmio; VEN = venlafaxina; MAA = ácido metacrílico; EGDMA = etileno glicol dimetacrilato

No procedimento 5 com a redução da razão molar VEN:MAA para 1:3, observamos apenas diminuição na eficácia da extração de VEN.

O EGDMA favoreceu as interações entre monômero e molécula molde e forneceu estabilidade mecânica à matriz polimérica. O tolueno favoreceu as reações e a porosidade do sorvente e a formação de partículas poliméricas mais esféricas. Além disto, o tolueno, por ser um solvente aprótico, favoreceu as ligações de hidrogênio do complexo (pré polimerização) formado por VEN e

MAA (SELLERGREN; SHEA, 1993). O MIP sintetizado em clorofórmio apresentou maior taxa de recuperação para a VEN. No entanto, a velocidade de percolação da amostra pelo sorvente (8 mg de fase MIP) foi cerca de sete vezes maior quando comparado ao MIP sintetizado em tolueno. Consequentemente, o tolueno foi selecionado como solvente de síntese por favorecer as taxas de recuperação e diminuir o tempo da extração.

AIBN apresenta baixo custo e ótima eficácia para polimerizações radiculares. A figura 8 ilustra o esquema da síntese do MIP, utilizando VEN como molécula molde.

Figura 8: Esquema de síntese otimizado para impressão molecular da VEN.

IV.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E QUÍMICA DOS MIPs

A técnica de MEV contribuiu para investigação das características morfológicas dos polímeros (MIP₁, MIP₄ e NIP₄) que foram sintetizados em diferentes solventes. A figura 9 mostra diferenças notáveis na morfologia do

polímero sintetizado em ACN (MIP_1), quando comparados aos polímeros sintetizados em tolueno (MIP_4 e NIP_4).

Figura 9: Micrografias dos polímeros sintetizados (a) em acetonitrila MIP_1 (VEM:MAA 1:5 mmol), (b) em tolueno MIP_4 (VEM:MAA 1:4 mmol) e (c) NIP_4 .

A porosidade resulta da insolubilidade de fases entre o solvente porogênico e a crescente cadeia polimérica no meio reacional (SELLERGREN; SHEA, 1993; SPIVAK, D. A., 2005). A figura 9a mostra que polímero sintetizado em ACN apresentou grandes aglomerados de partículas irregulares com diâmetros de 0.545 a 0.960 μm . Os polímeros sintetizados em tolueno apresentaram partículas regulares e esféricas com diâmetros que variaram de

1.480 a 2.228 μm para o NIP₄ (fig. 9c), e de 1.984 a 3.345 μm para o MIP₄ (fig. 9b). A diferença nos diâmetros das partículas nos polímeros MIP₄ e NIP₄ pode ser resultante das cavidades seletivas formadas durante a síntese do MIP₄.

A figura 10 ilustra o espectro vibracional na região do infravermelho para MIP₄ e NIP₄. Bandas relacionadas aos grupos funcionais dos reagentes de síntese incorporados às cadeias poliméricas podem ser observadas. As bandas em 1717 e 3507 cm^{-1} correspondem a carbonila (C=O) e hidroxila (OH), respectivamente. A banda em 1435 cm^{-1} corresponde às vibrações de ligação, estiramento simétrico (1256 cm^{-1}) e assimétrico (1152 cm^{-1}) da ligação C-O. Banda característica de ligação C-H em polímeros (2968 cm^{-1}) e harmônicos de OH em (1637 cm^{-1}) foram observadas no espectro (HARTMAN, 1976; KLEMM, 1995; LOPES; FASCIO, 2004).

Quanto à estabilidade dos polímeros sintetizados com MAA e EGDMA, segundo estudos realizados por Abdous (ABDOUSS *et al.*, 2012), entre 100 e 180°C ocorre decomposição relacionada ao monômero funcional e ao reticulante, gerando perda de aproximadamente 10% da massa do polímero e acima de 450°C todo material é decomposto.

Figura 10: Espectro FTIR para (a) MIP₄ e (b) NIP₄.

IV.3 OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO MISPE

Para miniaturizar o sistema analítico e reduzir o consumo de amostra biológica e de solvente orgânico, microdiscos foram utilizados como dispositivos de SPE. A otimização das variáveis SPE, tais como o pH da amostra, limpeza do sorvente e condições de dessorção, favoreceu a detectabilidade analítica, a seletividade do sorvente e o tempo da análise.

A figura 11 ilustra o aumento do percentual de recuperação, após a precipitação das proteínas das amostras de plasma e reconstituição do extrato seco em solução tampão de fosfato pH 8. A taxa de recuperação nestas condições foi de 84%, superior às obtidas utilizando soluções tampão em valores de pH 10 e 11. Considerando o valor de pKa da VEN (pKa = 9,5) (BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2008) e do ácido metacrílico (pKa =4,65) (DONG; DU; QIAN, 2008), a pré-concentração do fármaco em solução tampão pH 8 (VEN e MAA em suas formas ionizadas) favorece as ligações eletrostáticas entre os grupos funcionais da VEN (grupos básicos) e do MAA (grupos ácidos).

O tolueno e a acetonitrila também foram avaliados como solventes para a pré-concentração do fármaco, pois extrações realizadas no mesmo solvente de síntese podem contribuir para maior estabilidade e organização dos sítios específicos (SPIVAK, D.; GILMORE; SHEA, 1997). A taxa de recuperação utilizando o solvente tolueno foi de 62%, enquanto que em acetonitrila foi de 10%. A alta solubilidade de venlafaxina em acetonitrila, explica a baixa capacidade de sorção do fármaco no sorvente.

Figura 11: Avaliação de diferentes soluções e solventes utilizados na pré concentração de VEN na fase MIP. pH = 8 = solução tampão fosfato de sódio 0,01 mol L⁻¹ em pH 8; pH = 10 = solução tampão borato de sódio 0,01 mol L⁻¹ em pH 10; pH = 11 = solução tampão fosfato de sódio 0,01 mol L⁻¹ em pH 11.

Baseado em estudos prévios realizados em nosso Laboratório, antes do procedimento de dessorção, o sorvente (fase MIP) foi lavado com 200 µL de solução de ácido acético (0,1%), seguido de 100 µL de solução aquosa com 10% de metanol 10%, para a remoção dos componentes endógenos da matriz biológica.

Dentre os solventes de dessorção avaliados, o metanol favoreceu a eluição da VEN e seus metabólitos (Figura 12). O procedimento de dessorção realizado com ACN apresentou cromatogramas com sinais analíticos cerca de 50% menores do que o procedimento com metanol. Vários métodos cromatográficos (LC) utilizam a fase móvel como solvente de dessorção para posterior injeção direta de uma alíquota no sistema cromatográfico. No presente trabalho, a fase móvel não foi avaliada como solvente de dessorção, em razão de sua composição (acetato de amônio: ACN 70:30 v/v) e do grande volume para a eluição quantitativa.

Figura 12: Avaliação do metanol e acetonitrila no processo de dessorção (MISPE).

A figura 13 mostra a área obtida para VEN e seus metabólitos em função do volume de metanol utilizado na etapa de dessorção. O gráfico da figura

mostra que não houve aumento significativo do área do pico obtido para VEN e metabolitos a partir de 500 µL de metanol.

Figura 13: Avaliação do volume de metanol na etapa de dessorção.

Para a reutilização da fase MIP, esta foi lavada (inter ensaios) com as soluções MeOH:ACN 50:50 (v/v) e MeOH/água 50:50 (v/v). Na avaliação desta etapa de limpeza, diferentes volumes dessas soluções foram avaliados. A figura 14 mostra que a partir de 400 µL de cada solução de lavagem, não foi observado diminuição significativa nos sinais analíticos dos fármacos (VEN, ODV e NDV). Após este procedimento não foi observado efeito de memória (*carryover*). O efeito de memória foi avaliado com análise de uma amostra de branco de referência. Nos tempos de retenção dos fármacos não foram observados sinais analíticos.

Figura 14: Avaliação do volume das soluções de lavagem [MeOH:ACN 50:50 (v/v) e MeOH/água 50:50 (v/v)].

Dentre as variáveis avaliadas para o procedimento MISPE, a maior eficiência de extração foi obtida nas seguintes condições: reconstituição do extrato seco (após precipitação das proteínas) com 300 μL de solução tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8), remoção dos componentes endógenos com 200 μL de solução de ácido acético (0,1%), seguido de 100 μL de solução aquosa com 10% de metanol, e eluição dos analitos com 400 μL de metanol.

Após o procedimento de extração, a fase estacionária (MIP) foi lavada com 400 μL de metanol/acetonitrila 50:50 (v/v), seguido de 400 μL e metanol/água 50:50 (v/v). A fase MIP foi reutilizado aproximadamente 50 vezes, sem perda significativa da eficiência da extração.

IV.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMÉTRICAS

Inicialmente foram realizadas, no espectrometro de massas, infusões diretas de soluções padrão 200 ng mL^{-1} de cada analito a fim de se obter as condições de energia de colisão, energia do cone e transições MRM, correspondente ao maior sinal analítico (maior detectabilidade), como demonstrados na Tabela 6. Nestas condições, os analitos foram separados em menos de 3 min.

As transições mais intensas para VEN, ODV, NDV, e VEN D₆ foram determinados durante a otimização por infusão direta. A figura 15 mostra as prováveis estruturas dos íons envolvidos nas transições monitoradas para (a) VEN e (b) VEN-D₆. A figura 16 mostra as estruturas dos íons envolvidos nas transições monitoradas para (a) ODV e (b) NDV. Para ionização dos analitos foi utilizada a técnica ESI em modo positivo, desta forma a carga positiva pode estar em qualquer um dos três heteroátomos de cada analito. As figuras 15 e 16 (utilizando uma representação genérica dos íons pai) mostram os cátions envolvidos na transição MS/MS utilizada no presente trabalho.

Tabela 6: Transições MS/MS (MRM) utilizadas para quantificação e qualificação, energia do cone (DP), energia de colisão (CE) e tempo de retenção (t_r) para cada um dos fármacos estudados e do padrão interno

Analito	Transição MRM (m/z)	DP (V)	CE (V)	t_r (min)
VEN	278,2→57,9	30	20	2,48
	278,2→120,9			
ODV	264,2→58,1	30	15	1,26
	264,2→107,0			
NDV	264,1→43,8	25	15	2,13
	264,1→121,1			
VEN D₆	284,2→64,0	30	18	2,52
	284,2→266,0

Figura 15: Estrutura dos íons envolvidos nas transições MS/MS (MRM) de (a) VEN e (b) VEN-D₆.

Figura 16: Estrutura dos íons envolvidos nas transições MS/MS de ODV e NDV.

IV.5 SELETIVIDADE DO MIP

A avaliação da seletividade do MIP₄ foi realizada a partir de amostras de plasma branco de referência, enriquecidas com VEN e outros antidepressivos

com estruturas químicas diferentes dos analitos (figura 17). As amostras foram analisadas pelo procedimento MISPE/LC-MS/MS miniaturizado, descrito anteriormente, utilizando MIP₄ e NIP₄ como sorventes. As extrações (n= 3) realizadas com polímero impresso apresentaram taxa de recuperação de 84% para VEN e de 2 – 28% para os demais fármacos. A baixa sorção dos demais antidepressivos (clorpromazina, fluoxetina, clomipramina, imipramina e sertralina), comprova a seletividade da fase MIP₄ para a extração de VEN. O polímero não impresso apresentou baixa recuperação para a VEN (taxa de recuperação: 49%) e para os demais antidepressivos (taxas de recuperação menores que 40%). A sorção dos fármacos com estruturas diferentes junto à fase MIP₄ é atribuída, principalmente, ao excesso de monômeros funcionais (razão ótima foi de 1:4 VEN:MAA) que são incorporados de forma randômica nas cadeias poliméricas durante o processo de síntese. Estes monômeros interagem, de forma não covalente e não específica, com os grupos funcionais presentes nos compostos interferentes do meio (RACHKOV; MINOURA, 2000).

Figura 17: Avaliação das extrações MISPE realizadas com os sorventes MIP₄ e NIP₄ de amostras de plasma branco enriquecidas com antidepressivos (60 ng mL⁻¹). Estruturas químicas da (a) Venlafaxina; (b) Clorpromazina; (c) Fluoxetina; (d) Imipramina; (e) Clomipramina e (f) Sertralina, (g) Mirtazapina e (h) Paroxetina

Estes resultados de seletividade são semelhantes aos obtidos por Azodi-Deilami (AZODI-DEILAMI; ABDOUSS; HASANI, 2010), que avaliaram a capacidade de sorção da fase MIP (polimerização em massa, MAA - monômero funcional e EGDMA - reagente reticulante) para a extração de tramadol (utilizado como molécula molde) em plasma e urina na presença de outros fármacos (dextrometorfano, pseudoefedrina, difenidramina, hidroxizina e cetirizina). As taxas de recuperação para os fármacos com estrutura não semelhante ao tramadol variaram aproximadamente de 20 a 58%.

IV.6 VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO MISPE UHPLC-MS/MS

A validação analítica do método desenvolvido no presente trabalho foi realizada por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas em tandem (MISPE-LC-MS/MS) com amostras de plasma branco de referência enriquecidas com soluções padrão dos analitos de 3 a 700 ng mL⁻¹ e PI em concentração de 300 ng mL⁻¹.

A seletividade do método desenvolvido foi demonstrada pela comparação de cromatogramas de amostras de plasma branco de referência de seis diferentes procedências com estas amostras enriquecidas com VEN (3 ng mL⁻¹), ODV (5 ng mL⁻¹) e NDV (3 ng mL⁻¹). A figura 18 ilustra os cromatogramas representativos deste ensaio.

Figura 18: Cromatogramas representativos do método MISPE/UPLC-MS/MS de

amostra de plasma no LIQ e o respectivo branco de referência para VEN ($t_r = 2,48$ min), ODV ($t_r = 1,26$ min) e NDV ($t_r = 2,13$ min) nas concentrações de 3, 5 e 3 ng mL^{-1} respectivamente.

Como demonstrado na Figura 18, não foram observados picos interferentes dos componentes endógenos nos tempos de retenção dos analitos. A seletividade do método foi favorecida tanto pela fase molecularmente impressa e quanto pela análise de espectrometria de massas no modo MRM.

A linearidade do método foi avaliada com amostras de branco de referência enriquecidas com os analitos em 10 diferentes concentrações (análise em quintuplicata): 1, 3, 5, 9, 50, 100, 300, 500, 700 e 900 ng mL^{-1} . O método MISPE-LC-MS/MS apresentou linearidade para VEN na faixa de concentração de 3 a 700 ng mL^{-1} , para NDV de 3 e 500 ng mL^{-1} e para ODV de 5 e 700 ng mL^{-1} . As menores concentrações das curvas analíticas representam os LIQs, os quais apresentaram precisão com coeficientes de variação menores que 10% e exatidão com EPR menores que 16% (Tabelas 8 e 9).

Todos os pontos das curvas analíticas apresentaram coeficientes de variação menores que 10% e coeficientes de determinação maiores que 0,995 (Tabela 9).

Os ensaios de precisão (interensaios) apresentaram CV que variaram de 0,3 a 11,5% e os ensaios de exatidão (interensaios) apresentaram valores que variaram de 0,6 a 16%, Tabela 9.

Tabela 7: Faixa linear, coeficiente de determinação e limite de quantificação do método MISPE-LC-MS/MS para análise de VEN, ODV e NDV em amostras de plasma

Analito	Faixa linear	r ²	LIQ (ng mL ⁻¹)
	Regressão Linear		
VEN	(3 a 700 ng mL ⁻¹)	0,9950	3,0
	y = 0,0021x+ 0,0288		
ODV	(5 a 700 ng mL ⁻¹)	0,9964	5,0
	y = 0,0016x + 0,0392		
NDV	(3 a 500 ng mL ⁻¹)	0,9967	3,0
	y = 0,0009x + 0,0131		

Quanto à avaliação do efeito residual, as respostas de picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos foram inferiores a 20% (vinte por cento) da resposta (sinal analítico) dos analitos das amostras enriquecidas com concentrações correspondentes ao LIQ, e as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do padrão interno foram inferiores a 5% (cinco por cento) da resposta (sinal analítico) do padrão interno.

O efeito da matriz biológica na supressão da ionização é ilustrado na Tabela 9 por meio dos valores FMN, onde os coeficientes de variação foram menores que 10%.

Tabela 8: Precisão e exatidão interensaios do método MISPE-LC-MS/MS para determinação de VEN, ODV e NDV em amostra de plasma

Compostos	Concentração (ng mL ⁻¹)	Precisão Intra (CV/%)	Precisão Inter (EPR/%)	Exatidão (EPR/%)
VEN	3	9,9	11,3	11,1
	5	5,6	4,2	-10,6
	100	1,02	2,5	6,9
	500	0,28	1,1	-11,8
	700	2,23	1,8	5,4
ODV	5	10,8	3,8	-16,0
	9	5,9	2,9	11,3
	100	5,3	1,5	-6,0
	500	2,5	1,8	4,7
	700	4,6	2,3	0,63
NDV	3	8,6	11,3	9,5
	5	11,5	13,5	-1,7
	100	3,1	7,2	7,0
	300	6,9	6,5	-7,6
	500	4,4	5,7	2,4

Os analitos mostraram-se estáveis, quando armazenados a 10°C durante 1, 3 e 6 dias, após procedimento MISPE (figura 19). Estes ensaios foram realizados para tornar possível o armazenamento dos extratos obtidos e análise de um número maior de amostras em um dia de trabalho.

Estes testes de estabilidade corroboram com os resultados obtidos por Butzbach (BUTZBACH *et al.*, 2013), onde VEN e outros antidepressivos seletivos de serotonina permaneceram estáveis por 57 dias.

A Tabela 10 mostra a média dos valores do fator de matriz normalizada e os coeficientes de variação para CQA e CQB de VEN, ODV e NDV.

Tabela 9: Valores de FMN para CQA e CQB de VEN, ODV e NDV

Analito	Média FMN	Média FMN	CV (%)	CV (%)
	(CQB)	(CQA)	(CQB)	(CQA)
VEN	0,963	0,978	5,0	3
ODV	0,844	0,831	1,52	2,6
NDV	0,875	0,963	10,0	5,0

Para avaliar a repetitividade do procedimento de síntese, três dispositivos MISPE miniaturizados foram preparados com polímeros sintetizados em diferentes períodos. As análises (mini-MISPE/UPLC-MS/MS) de amostras de plasma branco de referência enriquecidas com os analitos na concentração de 50 ng mL⁻¹, apresentaram coeficientes de variação menores

que 10%. Estas análises foram realizadas em quintuplicata para cada dispositivo MISPE.

Figura 19: Avaliação da estabilidade dos analitos armazenados a 10°C no período de 1 a 6 dias. Estes ensaios foram realizados com amostras de plasma branco de referência enriquecidas com VEN, ODV e NDV na concentração de 700 ng mL⁻¹.

IV.7 DETERMINAÇÃO DE VEN E SEUS PRINCIPAIS METABÓLITOS EM AMOSTRAS DE PACIENTES

O método MISPE-LC-MS/MS miniaturizado foi empregado para determinação de VEN, ODV e NDV em amostras de plasma coletadas de paciente em terapia com Efexor® com dose diária de 150 mg por dia. As

amostras de plasma foram coletadas 2 e 5 horas após a administração do fármaco.

As concentrações plasmáticas determinadas foram as seguintes: 246,8 ng mL⁻¹ de VEN e 59,3 ng mL⁻¹ de ODV, para amostras coletadas 02 horas após a administração do fármaco. Já após 5 horas, as concentrações plasmáticas determinadas foram as seguintes: VEN: 96,1, ng mL⁻¹ , ODV: 103,2 ng mL⁻¹ e NDV de 9,2 ng mL⁻¹.

A tabela 10 ilustra as concentrações plasmáticas dos fármacos determinadas para paciente em terapia.

O paciente em terapia com Efexor[®] apresentou concentrações plasmáticas de VEN no intervalo terapêutico (100 a 500 ng mL⁻¹). No intervalo entre as coletas a concentração de VEN diminuiu, enquanto a dos metabólitos aumentou. A NDV pôde ser detectada no plasma duas horas após a dosagem, no entanto sua concentração foi inferior a 3 ng mL⁻¹, ficando fora da faixa linear do método.

Tabela 10: Concentrações plasmáticas de VEN, ODV e NDV determinadas pelo método MISPE-LC-MS/MS miniaturizado 2 e 5 horas após a administração do medicamento

Fármaco	Concentração plasmática (ng mL ⁻¹)	
	(CV)	
	2 horas após a administração	5 horas após a administração
VEN	246,8	96,1
	(6,6%)	(4,3%)
ODV	59,3	103
	(5,5 %)	(8,3 %)
NDV	< 3	9,2
	(12 %)	(2,9 %)

IV.8 COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM OS DESCRITOS NA LITERATURA

Madrakian e colaboradores (MADRAKIAN *et al.*, 2015) realizaram determinação espectrofluorimétrica de VEN em amostras biológicas. Neste trabalho nanopartículas de magnetita ligadas à sílica foram revestidas com

MIP, sintetizado via polimerização radicalar em suspensão, para obtenção de uma fase sorvente seletiva. Os reagentes de síntese utilizados foram: monoamina (monômero funcional) (MAHMOODI *et al.*, 2011), EGDMA (reagente reticulante), persulfato de amônio (iniciador radicalar) em água duplamente destilada. A metodologia utilizada é interessante, porém utiliza grandes volumes de amostra, de solventes e longo tempo de análise (35 min), quando comparado ao presente trabalho. O método foi aplicado para amostras de plasma e de urina, onde 40 mL de urina foram diluídos em 50 mL de tampão para se obter linearidade de 2 – 400 ng mL⁻¹. A mesma linearidade foi obtida para análise em plasma, precipitando as proteínas de 2,5 mL de plasma com enriquecido com VEN com 1 mL de ACN e diluição até 100 mL com tampão. Em ambas as matrizes a tecnologia não abrangeu todo o intervalo terapêutico da VEN, compreendido entre 100 e 500 ng mL⁻¹ (LEVINE *et al.*, 1996; MAZUR *et al.*, 2003). Além disso a dessorção do processo SPE é realizada consumindo quatro vezes o volume de solvente orgânico utilizado no presente trabalho.

Berm e colaboradores (BERM *et al.*, 2014) determinaram VEN e ODV em gotas de sangue seco (40-80 µL de amostra) para fins de monitorização terapêutica. A extração dos analitos foi realizada com 250 µL de uma mistura 1:3 de acetonitrila e metanol. O sobrenadante foi transferido para um vial e 5 µL foram injetados no LC-MS/MS. A metodologia aplicada e validada pelos autores se demonstrou eficiente, com taxas de recuperação entre 60 e 80% e baixo consumo de solventes. No entanto, a técnica de extração líquido-líquido apresenta pouca seletividade quando comparada com a MISPE. Desta forma os componentes endógenos da matriz são coextraídos e injetados no sistema cromatográfico, diminuindo o tempo de vida útil da coluna e causando efeito de

supressão no espectrômetro de massas com ionização por eletrospray. O método ainda apresentou menor sensibilidade analítica, com LIQ de 20 ng mL⁻¹ utilizando promazina como PI.

Shah e colaboradores (SHAH *et al.*, 2009) determinaram VEN em plasma de rato por LC-MS/MS utilizando extração líquido-líquido com o solvente metil terc-butil éter. Neste trabalho uma mistura de 1mL do solvente com 100 µL de plasma foi agitada em vórtex por 20 min e centrifugada por 10 min. O sobrenadante foi seco e reconstituído em 150 µL para posterior injeção de 20 µL. A técnica se demonstrou eficiente sendo linear de 20 a 8000 ng mL⁻¹, no entanto apresenta algumas desvantagens frente ao presente trabalho. No trabalho de Gaurang, a técnica de extração apresenta baixa seletividade, ocasionando na coextração dos componentes endógenos interferentes, o que diminui o tempo de vida útil da coluna cromatográfica e favorece a supressão iônica. Além disso, o autor utiliza carbamazepina como padrão interno. Estudo realizado por Ciusani (CIUSANI *et al.*, 2004) revela que o uso concomitante de VEN e carbamazepina no tratamento de pacientes com depressão é interessante devido à sua eficácia, tolerância e ausência de modificações farmacocinéticas. Desta forma, a carbamazepina pode ser considerada um interferente na determinação de amostras de pacientes, influenciando no resultado final da análise.

Reddy e colaboradores (REDDY *et al.*, 2013) determinaram VEN e ODV em plasma humano por LC-MS/MS utilizando a técnica de extração líquido-líquido com uma mistura de metil terc-butil éter e n hexano, 60:40 (v/v). Neste trabalho, 50 µL de solução de PI e 2,5 mL de solvente são adicionados a 250 µL de plasma. Após agitação e centrifugação o sobrenadante é seco e

resuspendido em fase móvel. O procedimento desenvolvido pelos autores é simples, eficaz e altamente sensível, obtendo faixa linear de 0,1 a 300 e 0,2 a 600 ng mL⁻¹ para VEN e ODV respectivamente. No entanto, o método consome grande volume de solvente orgânico, não abrange completamente o intervalo terapêutico da venlafaxina, compreendido entre 100 e 500 ng mL⁻¹ (LEVINE *et al.*, 1996; MAZUR *et al.*, 2003). Além disso, foi utilizado fluoxetina como padrão interno, fármaco que pode estar presente nas amostras dos pacientes e atuar como interferente no processo de análise. O presente método utiliza VEN-D₆, substância mais adequada no uso de padronização interna para determinações de venlafaxina por MS/MS. A Tabela 11 resume as principais características de cada metodologia.

Tabela 11: Recentes métodos analíticos utilizados na determinação de VEN e ODV em amostras biológicas

Analito(s)	Matriz Biológica	Técnicas Analíticas	Volume de Amostra (mL)	Volume solvente orgânico (mL)	Padrão interno	Linearidade (ng mL ⁻¹)	Referência
VEN						3-700	
ODV	Plasma	MISPE/UPLC-MS/MS	0,2	0,9	VEN-D ₆	5-700	Presente
NDV						3-500	Trabalho
VEN	Urina		40	2,5			Madrakian
	Plasma	MISPE	2	2,5	--	2-400	<i>et al</i> , 2015.
VEN	Sangue						
ODV	Seco	ELL	0,06 - 0,08	0,35	Promazina	20-1000	Berm <i>et al</i> , 2014
VEN	Plasma						
ODV		ELL	0,25	2,5	Fluoxetina	0,1 - 300 0,2 - 600	Reddy <i>et al</i> , 2013
VEN	Plasma de rato						
ODV		ELL	0,1	1,0	CBM	10-8000	Shah <i>et al</i> , 2009

ELL = Extração líquido-líquido; CBM = Carbamazepina; VEN-D₆ = Venlafaxina deuterada com seis átomos de deutério.

VI. CONCLUSÕES

O emprego do simples e reprodutível modo de síntese radicalar por precipitação, utilizando a abordagem não covalente, e a otimização deste procedimento de síntese, principalmente da razão molar da molécula molde:monômero funcional e do solvente reacional (agente porogênico), foram essenciais para a obtenção de seletiva fase polimérica com alto rendimento e partículas esféricas e uniformes.

O uso da VEN como molécula molde originou sorventes com sítios molecularmente impressos com tamanho, forma e funções complementares adequados para a pré-concentração seletiva de VEN e seus principais metabólitos (ODV e NDV) em amostras de plasma. Os antidepressivos com estrutura química não análoga à VEN apresentaram baixa capacidade de sorção através de interações não específicas. O polímero não impresso (NIP) apresentou baixa capacidade de sorção para a VEN e para os demais antidepressivos avaliados.

Segundo os parâmetros de validação analítica avaliados, o método MISPE/UPLC-MS/MS proposto é adequado para a determinação de VEN e seus principais metabólitos para fins de monitorização terapêutica. A faixa de linearidade deste método contemplou o intervalo terapêutico preconizado, permitindo quantificações de VEN e seu metabólito ativo (ODV) em concentrações de até 700 ng mL⁻¹.

A aplicabilidade do método padronizado para quantificação de VEN em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica foi comprovada através da análise de amostras de plasma de paciente em terapia com Efexor[®].

O método proposto quando comparado aos descritos na literatura para a determinação de VEN em amostras de plasma apresentou as seguintes vantagens: menor volume de amostra de plasma, menor volume de solvente orgânico, padrão interno adequado (deuterado) e fase extratora seletiva e reutilizável.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOUSS, M. et al. Synthesis of molecularly imprinted polymer as a sorbent for solid phase extraction of citalopram from human serum and urine. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 23, n. 6, p. 1543-1552, 2012.

AHMADI, F.; AHMADI, J.; RAHIMI-NASRABADI, M. Computational approaches to design a molecular imprinted polymer for high selective extraction of 3,4-methylenedioxymethamphetamine from plasma. **J Chromatogr A**, v. 1218, n. 43, p. 7739-7747, 2011.

ALEXANDER, C. et al. Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. **J Mol Recognit**, v. 19, n. 2, p. 106-180, 2006.

ARDAKANI, Y. H.; FOROUMADI, A.; ROUINI, M. R. Development and validation of a rapid HPLC- fluorescence method for simultaneous determination of venlafaxine and its major metabolites in human plasma. **Daru**, v. 18, n. 2, p. 97-102, 2010.

ARSHADY, R.; MOSBACH, K. Synthesis of Substrate-Selective Polymers by Host-Guest Polymerization. **Macromolecular Chemistry and Physics-Makromolekulare Chemie**, v. 182, n. 2, p. 687-692, 1981.

AZODI-DEILAMI, S.; ABDOUSS, M.; HASANI, S. A. Preparation and utilization of a molecularly imprinted polymer for solid phase extraction of tramadol. **Central European Journal of Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 861-869, 2010.

BALASUBRAMANIAM, J. et al. Effect of superdisintegrants on dissolution of cationic drugs. **Dissolution Technologies**, v. 15, n. 2, p. 18, 2008.

BASOZABAL, I. et al. Rational design and chromatographic evaluation of histamine imprinted polymers optimised for solid-phase extraction of wine samples. **J Chromatogr A**, v. 1308, p. 45-51, 2013.

BAUMANN, P. et al. The AGNP-TDM expert group consensus guidelines: therapeutic drug monitoring in psychiatry. **Pharmacopsychiatry**, v. 37, n. 6, p. 243-265, 2004.

BENITO-PENA, E. et al. Water-compatible molecularly imprinted polymer for the selective recognition of fluoroquinolone antibiotics in biological samples. **Anal Bioanal Chem**, v. 393, n. 1, p. 235-245, 2009.

BERM, E. J. et al. Determination of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine in dried blood spots for TDM purposes, using LC-MS/MS. **Anal Bioanal Chem**, v. 406, n. 9-10, p. 2349-2353, 2014.

BHALEKAR, M. R. et al. Statistical Optimization of Sustained Release Venlafaxine HCl Wax Matrix Tablet. **Indian J Pharm Sci**, v. 70, n. 4, p. 472-476, 2008.

BOMPART, M.; HAUPT, K. Molecularly Imprinted Polymers and Controlled/Living Radical Polymerization. **Australian Journal of Chemistry**, v. 62, n. 8, p. 751-761, 2009.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N.º 27, de 17 de maio de 2012. Publicada no Diário Oficial da União de 22 maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/564310004b60537e891f9baf8fded4db/RDC+27+12+Valida%C3%A7%C3%A3o+de+M%C3%A9todos+Bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acessado em: 02/2015.

BUTZBACH, D. M. et al. Stability of serotonin-selective antidepressants in sterile and decomposing liver tissue. **J Forensic Sci**, v. 58 Suppl 1, p. S117-125, 2013.

CARABIAS-MARTINEZ, R.; RODRIGUEZ-GONZALO, E.; HERRERO-HERNANDEZ, E. Determination of triazines and dealkylated and hydroxylated metabolites in river water using a propazine-imprinted polymer. **Journal of Chromatography A**, v. 1085, n. 2, p. 199-206, 2005.

CHEN, Y. et al. Sample preparation. **J Chromatogr A**, v. 1184, n. 1-2, p. 191-219, 2008.

CIUSANI, E. et al. Combination therapy with venlafaxine and carbamazepine in depressive patients not responding to venlafaxine: pharmacokinetic and clinical aspects. **Journal of Psychopharmacology**, v. 18, n. 4, p. 559-566, 2004.

CLAUSEN, D. N.; VISENTAINER, J. V.; TARLEY, C. R. Development of molecularly imprinted poly(methacrylic acid)/silica for clean-up and selective extraction of cholesterol in milk prior to analysis by HPLC-UV. **Analyst**, v. 139, n. 19, p. 5021-5027, 2014.

CORMACK, P. A.; ELORZA, A. Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 804, n. 1, p. 173-182, 2004.

DASGUPTA, A. **Handbook of drug monitoring methods : therapeutics and drugs of abuse**. Totowa, N.J. London. Humana. Springer distributor, 2008. x, 445 p. ISBN 9781588297808 (hbk.).

DONG, H.; DU, H.; QIAN, X. Theoretical Prediction of p K a Values for Methacrylic Acid Oligomers Using Combined Quantum Mechanical and Continuum Solvation Methods. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 112, n. 49, p. 12687-12694, 2008.

DU, B. et al. A novel restricted access material combined to molecularly imprinted polymers for selective solid-phase extraction and high performance liquid chromatography determination of 2-methoxyestradiol in plasma samples. **Talanta**, v. 129, p. 465-472, 2014.

DUTTA, L. et al. Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous stereoselective determination of venlafaxine and its major metabolite, O-desmethylvenlafaxine, in human plasma. **Biomed Chromatogr**, v. 27, n. 5, p. 622-635, 2013.

FARHADI, K.; HATAMI, M.; MATIN, A. A. Microextraction techniques in therapeutic drug monitoring. **Biomed Chromatogr**, v. 26, n. 8, p. 972-989, 2012.

FEIGHNER, J. P. Mechanism of action of antidepressant medications. **J Clin Psychiatry**, v. 60 Suppl 4, p. 4-11; discussion 12-13, 1999.

FISCHER, D. C. H. Fundamentos de cromatografia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 308-308, 2006.

GRASMADER, K. et al. Relationship between mirtazapine dose, plasma concentration, response, and side effects in clinical practice. **Pharmacopsychiatry**, v. 38, n. 3, p. 113-117, 2005.

GUNASEKARA, N. S.; NOBLE, S.; BENFIELD, P. Paroxetine. An update of its pharmacology and therapeutic use in depression and a review of its use in other disorders. **Drugs**, v. 55, n. 1, p. 85-120, 1998.

HARTMAN, K. A student operated animated infrared spectroscopy teaching model. **Journal of Chemical Education**, v. 53, n. 2, p. 111, 1976.

HARUN, N.; ANDERSON, R. A.; CORMACK, P. A. G. Analysis of ketamine and norketamine in hair samples using molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 7, p. 2449-2459, 2010.

HAUPT, K.; MOSBACH, K. Molecularly imprinted polymers in chemical and biological sensing. **Biochem Soc Trans**, v. 27, n. 2, p. 344-350, 1999.

HENDSET, M. et al. The complexity of active metabolites in therapeutic drug monitoring of psychotropic drugs. **Pharmacopsychiatry**, v. 39, n. 4, p. 121-127, 2006.

HERCEGOVA, A.; DOMOTOROVA, M.; MATISOVA, E. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. **J Chromatogr A**, v. 1153, n. 1-2, p. 54-73, 2007.

HERNANDEZ-BORGES, J. et al. Sample treatments prior to capillary electrophoresis-mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 1153, n. 1-2, p. 214-226, 2007.

HIEMKE, C. et al. AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update 2011. **Pharmacopsychiatry**, v. 44, n. 6, p. 195-235, 2011.

HOLLIDAY, S. M.; BENFIELD, P. Venlafaxine. A review of its pharmacology and therapeutic potential in depression. **Drugs**, v. 49, n. 2, p. 280-294, 1995.

HORST, W. D.; PRESKORN, S. H. Mechanisms of action and clinical characteristics of three atypical antidepressants: venlafaxine, nefazodone, bupropion. **J Affect Disord**, v. 51, n. 3, p. 237-254, 1998.

HUBICKA, U. et al. Separation and characterization of ciprofloxacin, difloxacin, lomefloxacin, norfloxacin, and ofloxacin oxidation products under potassium permanganate treatment in acidic medium by UPLC-MS/MS. **Talanta**, v. 109, p. 91-100, 2013.

KIM, K. M. et al. Rapid and sensitive determination of sertraline in human plasma using gas chromatography-mass spectrometry. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 769, n. 2, p. 333-339, 2002.

KLAMERUS, K. J. et al. Introduction of a composite parameter to the pharmacokinetics of venlafaxine and its active O-desmethyl metabolite. **J Clin Pharmacol**, v. 32, n. 8, p. 716-724, 1992.

KLEMM, L. H. Use of Degrees of Unsaturation in Solving Organic Structural Problems. **Journal of Chemical Education**, v. 72, n. 5, p. 425-428, 1995.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LEVINE, B. et al. Distribution of venlafaxine in three postmortem cases. **J Anal Toxicol**, v. 20, n. 6, p. 502-505, 1996.

LI, K. M.; THOMPSON, M. R.; MCGREGOR, I. S. Rapid quantitation of fluoxetine and norfluoxetine in serum by micro-disc solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography-ultraviolet absorbance detection. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 804, n. 2, p. 319-326, 2004.

LIAN, Z. R.; HE, X. L.; WANG, J. T. Determination of sulfadiazine in Jiaozhou Bay using molecularly imprinted solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatography with a diode-array detector. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 957, p. 53-59, 2014.

LIU, M. J. et al. Synthesis of tetracycline-imprinted polymer microspheres by reversible addition-fragmentation chain-transfer precipitation polymerization using polyethylene glycol as a coporogen. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 9-10, p. 1118-1125, 2014.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

MADRAKIAN, T. et al. Spectrofluorometric determination of venlafaxine in biological samples after selective extraction on the superparamagnetic surface molecularly imprinted nanoparticles. **Analytical Methods**, v. 7, n. 2, p. 428-435, 2015.

MAHMOODI, N. M. et al. Synthesis, characterization and dye removal ability of high capacity polymeric adsorbent: polyaminoimide homopolymer. **J Hazard Mater**, v. 198, p. 87-94, 2011.

MALDANER, L.; JARDIM, I. UHPLC—Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 197-207, 2012.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, p. 214-222, 2009.

MAYES, A. G.; WHITCOMBE, M. J. Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 57, n. 12, p. 1742-1778, 2005.

MAZUR, J. E.; DOTY, J. D.; KRYGIEL, A. S. Fatality related to a 30-g venlafaxine overdose. **Pharmacotherapy**, v. 23, n. 12, p. 1668-1672, 2003.

MEHROTRA, R. C. Chemistry of Alkoxide Precursors. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 121, n. 1-3, p. 1-6, 1990.

MELO, L. P.; QUEIROZ, M. E. C. A molecularly imprinted polymer for microdisc solid-phase extraction of parabens from human milk samples. **Analytical Methods**, v. 5, n. 14, p. 3538-3545, 2013.

MINCZEWSKI, J. et al. **Separation and preconcentration methods in inorganic trace analysis**. Chichester, West Sussex, New York. E. Horwood. Halsted Press, 1982. xi, 543 p. ISBN 0853121656.

MOAD, G.; SOLOMON, D. H.; MOAD, G. **The chemistry of radical polymerization**. 2nd fully rev. Amsterdam. Boston. Elsevier, 2006. xxvi, 639 p. ISBN 0080442889 (alk. paper).

MOISEWITSCH, J. R. The role of serotonin and neurotransmitters during craniofacial development. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 11, n. 2, p. 230-239, 2000.

MOISEWITSCH, J. R.; LAUDER, J. M. Serotonin regulates mouse cranial neural crest migration. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 16, p. 7182-7186, 1995.

MORENO, R. A.; MORENO, D. H.; SOARES, M. B. D. M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, p. 24-40, 1999.

MURRAY, K. K. et al. IUPAC standard definitions of terms relating to mass spectrometry. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 229, p. U123-U123, 2005.

NEBIGIL, C. G. et al. Serotonin 2B receptor is required for heart development. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 17, p. 9508-9513, 2000.

NOVAKOVA, L.; VLCKOVA, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation. **Anal Chim Acta**, v. 656, n. 1-2, p. 8-35, 2009.

NUNEZ, L. et al. Molecularly imprinted polymer for the extraction of parabens from environmental solid samples prior to their determination by high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. **Talanta**, v. 80, n. 5, p. 1782-1788, 2010.

PEREIRA, L. A.; RATH, S. Molecularly imprinted solid-phase extraction for the determination of fenitrothion in tomatoes. **Anal Bioanal Chem**, v. 393, n. 3, p. 1063-1072, 2009.

PEREZ-MORAL, N.; MAYES, A. G. Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 504, n. 1, p. 15-21, 2004.

PETROVIC, M. et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. **J Chromatogr A**, v. 1067, n. 1-2, p. 1-14, 2005.

PICHON, V. Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, n. 1-2, p. 41-53, 2007.

PILETSKY, S. A.; ALCOCK, S.; TURNER, A. P. F. Molecular imprinting: at the edge of the third millennium. **Trends in Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 9-12, 2001.

PISSOLATTO, T. M.; CARAMÃO, E. B.; MARTINS, A. F. Solid phase extraction of chlorinated phenolics in aqueous solution. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 8, n. 1, p. 5-12, 1996.

PODHORNIK, L. V.; NEGRON, J. F.; GRIFFITH, F. D., JR. Gas chromatography with pulsed flame photometric detection multiresidue method for organophosphate pesticide and metabolite residues at the parts-per-billion level in representative commodities of fruits and vegetable crop groups. **J AOAC Int**, v. 84, n. 3, p. 873-890, 2001.

POLEN, K. N. et al. Association between reported venlafaxine use in early pregnancy and birth defects, national birth defects prevention study, 1997-2007. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 97, n. 1, p. 28-35, 2013.

QIN, F. et al. Simultaneous quantification of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine in human plasma by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 878, n. 7-8, p. 689-694, 2010.

RACHKOV, A.; MINOURA, N. Recognition of oxytocin and oxytocin-related peptides in aqueous media using a molecularly imprinted polymer synthesized by the epitope approach. **Journal of Chromatography A**, v. 889, n. 1-2, p. 111-118, 2000.

RAWLINGS, J. O.; PANTULA, S. G.; DICKEY, D. A. **Applied regression analysis: a research tool**. Springer Science & Business Media, 1998. ISBN 0387984542.

REDDY, D. C. et al. High Throughput and Sensitive Lc-Ms/Ms Method for the Estimation of Venlafaxine and Its Active Metabolite O-Desmethyl Venlafaxine in Human Plasma and Its Application to a Pharmacokinetic Study. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 36, n. 7, p. 897-913, 2013.

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

RUWE, F. J. et al. Mirtazapine and paroxetine: a drug-drug interaction study in healthy subjects. **Hum Psychopharmacol**, v. 16, n. 6, p. 449-459, 2001.

SALIAN, V. D.; BYRNE, M. E. Living Radical Polymerization and Molecular Imprinting: Improving Polymer Morphology in Imprinted Polymers. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 298, n. 4, p. 379-390, 2013.

SASAKI, S. et al. Molecularly imprinted protein recognition thin films constructed by controlled/living radical polymerization. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 2, p. 200-205, 2015.

SELLERGREN, B.; SHEA, K. J. Influence of Polymer Morphology on the Ability of Imprinted Network Polymers to Resolve Enantiomers. **Journal of Chromatography**, v. 635, n. 1, p. 31-49, 1993.

SHAH, G. R. et al. Simultaneous determination of venlafaxine and its main active metabolite O-desmethyl venlafaxine in rat plasma by LC-MS/MS. **Analytical sciences**, v. 25, n. 10, p. 1207-1210, 2009.

SILVESTRI, D. et al. Polymeric devices containing imprinted nanospheres: a novel approach to improve recognition in water for clinical uses. **Analytica Chimica Acta**, v. 542, n. 1, p. 3-13, 2005.

SONG, R. et al. Molecularly imprinted solid-phase extraction of glutathione from urine samples. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 44, p. 69-75, 2014.

SONG, S. Q. et al. Extraction of chlorpromazine with a new molecularly imprinted polymer from pig urine. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 11, p. 1209-1214, 2008.

SPIVAK, D.; GILMORE, M. A.; SHEA, K. J. Evaluation of binding and origins of specificity of 9-ethyladenine imprinted polymers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 19, p. 4388-4393, 1997.

SPIVAK, D. A. Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 12, p. 1779-1794, 2005.

SUENAGA, E. M. et al. Automated determination of venlafaxine in human plasma by on-line SPE-LC-MS/MS. Application to a bioequivalence study. **J Sep Sci**, v. 32, n. 4, p. 637-643, 2009.

SWARTZ, M. E. UPLC™: An Introduction and Review. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, n. 7-8, p. 1253-1263, 2005.

TAKANO, A.; HALLDIN, C.; FARDE, L. SERT and NET occupancy by venlafaxine and milnacipran in nonhuman primates: a PET study. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 226, n. 1, p. 147-153, 2013.

TAMAYO, F. G.; TURIEL, E.; MARTIN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: recent developments and future trends. **J Chromatogr A**, v. 1152, n. 1-2, p. 32-40, 2007.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, v. 28, p. 1076-1086, 2005.

VESSECCHI, R. et al. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Quim. Nova**, v. 34, n. 10, p. 1875-1887, 2011.

WANG, D. X.; CHONG, S. L.; MALIK, A. Sol-gel column technology for single-step deactivation, coating, and stationary-phase immobilization in high-resolution capillary gas chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 22, p. 4566-4576, 1997.

WANG, H. S.; DONG, X. C.; YANG, M. X. Development of separation materials using controlled/living radical polymerization. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 31, p. 96-108, 2012.

WEBB, K. et al. Methodology for accurate mass measurement of small molecules. **Best practice guide. LGC Limited, Tddington**, p. 1-8, 2004.

WEI, S.; MIZAIKOFF, B. Recent advances on noncovalent molecular imprints for affinity separations. **J Sep Sci**, v. 30, n. 11, p. 1794-1805, 2007.

WULFF, G.; SARHAN, A. Use of Polymers with Enzyme-Analogous Structures for Resolution of Racemates. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 11, n. 4, p. 33-34, 1972.

YAN, H. et al. Hybrid molecularly imprinted polymers synthesized with 3-aminopropyltriethoxysilane-methacrylic acid monomer for miniaturized solid-phase extraction: A new and economical sample preparation strategy for determination of acyclovir in urine. **J Chromatogr A**, v. 1346, p. 16-24, 2014.

YAN, H. Y.; ROW, K. H. Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 7, n. 5-6, p. 155-178, 2006.

YE, L.; CORMACK, P. A. G.; MOSBACH, K. Molecularly imprinted monodisperse microspheres for competitive radioassay. **Analytical Communications**, v. 36, n. 2, p. 35-38, 1999.

ZHANG, H. Controlled/“living” radical precipitation polymerization: A versatile polymerization technique for advanced functional polymers. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 3, p. 579-600, 2013.

ZHANG, X. et al. Sensitive detection of bisphenol A in complex samples by in-column molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with capillary electrophoresis. **Microchemical Journal**, v. 121, n. 0, p. 1-5, 2015.

ZHU, Z.; NEIRINCK, L. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of paroxetine in human plasma. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 780, n. 2, p. 295-300, 2002.

ŻWIR-FERENC, A.; BIZIUK, M. Solid phase extraction technique—trends, opportunities and applications. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n. 5, p. 677-690, 2006.