Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Avaliação da técnica SPME/LC na análise de antidepressivos em amostra de plasma para fins de monitorização terapêutica

Bruno José Gonçalves da Silva

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

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

RIBEIRÃO PRETO -SP

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva , Bruno José Gonçalves

Avaliação da técnica SPME/LC na análise de antidepressivos em amostra de plasma para fins de monitorização terapêutica. Ribeirão Preto, 2007.

126 p.; 30cm

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

Orientadora: Queiroz, Maria Eugênia Costa

1. SPME 2. Validação Analítica. 3. Antidepressivos. 4. Monitorização terapêutica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	- 1 -
1.1. DEPRESSÃO	- 1 -
1.2. ANTIDEPRESSIVOS	- 2 -
1.2.1. INIBIDORES SELETIVOS DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA (ISRSs).....	- 3 -
1.2.2. ANTIDEPRESSIVO NORADRENÉRGICO E ESPECÍFICO SEROTONINÉRGICO (ANES) – MIRTAZAPINA	- 4 -
1.2.3. ANTIDEPRESSIVO INIBIDOR DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA E NORADRENALINA (IRSN) – DULOXETINA.....	- 4 -
1.3. MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA	- 7 -
1.4. MÉTODOS ANALÍTICOS	- 8 -
1.4.1. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)	- 9 -
1.4.1.1. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO SPME	- 15 -
1.4.2. “in tube” SPME	- 21 -
1.4.2.1. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO “in tube” SPME	- 26 -
1.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA	- 30 -
1.6. DETECTORES.....	- 32 -
1.7. VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	- 34 -
2. OBJETIVOS	- 38 -
3. PARTE EXPERIMENTAL	- 39 -
3.1. PADRÕES ANALÍTICOS E REAGENTES	- 39 -
3.2. AMOSTRAS DE PLASMA	- 39 -
3.3. INSTRUMENTAÇÃO SPME	- 40 -
3.4. SPME/LC	- 41 -
3.4.1. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	- 41 -
3.4.2 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO SPME	- 42 -
3.4.3. VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	- 43 -

3.5. “in tube” SPME/LC	- 43 -
3.5.1. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	- 43 -
3.5.2. DESENVOLVIMENTO DO PROGRAMA DO INJETOR AUTOMÁTICO (LC) PARA AS ANÁLISES “IN TUBE” SPME.	- 44 -
3.5.3. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO “in tube” SPME	- 46 -
3.5.4. PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	- 47 -
3.5.5. VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	- 48 -
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	- 48 -
4.1. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA LC/UV	- 48 -
4.2. MÉTODO SPME/LC COM DESSORÇÃO “OFF LINE”	- 49 -
4.2.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES SPME.....	- 49 -
4.2.2. VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO SPME/LC.....	- 56 -
4.2.3. ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PLASMA DE PACIENTES: APLICAÇÃO DO MÉTODO SPME/LC.	- 63 -
4.3. MÉTODO “in tube” SPME/LC	- 65 -
4.3.1. OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS “in tube” SPME.....	- 65 -
4.3.2. PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS	- 71 -
4.3.3. VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO “in tube” SPME/LC.....	- 73 -
4.3.4. ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PLASMA DE PACIENTES: APLICAÇÃO DO MÉTODO “in tube” SPME/LC.	- 79 -
5. COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS SPME E “in tube” SPME PARA ANÁLISE DE ANTIDEPRESSIVOS NÃO-TRICÍCLICOS EM AMOSTRAS DE PLASMA.	- 81 -
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	- 83 -
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	- 84 -
8. REFERÊNCIAS	- 86 -

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

ANEXOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADT's – Antidepressivos Tricíclicos

ANES – Antidepressivos Noradrenérgicos e Específicos Serotoninérgicos

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CG- Cromatografia Gasosa

CV – Coeficiente de Variação

CW – Carbowax

DAD – Detector de Arranjo de Diodos

DVB – Divinilbenzeno

IMAO's – Antidepressivos Inibidores de Monoaminoxidase

ISRS's – Antidepressivos Inibidores da Recaptação de Serotonina

IRSN's – Antidepressivos Seletivos da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina

K – Coeficiente de Partição

K_A – Constante de Afinidade

LC – Cromatografia Líquida

LD – Limite de Detecção

LLE – Extração Líquido-Líquido

LQ – Limite de Quantificação

MIP – Polímeros Molecularmente Impressos

MS – Detector de Espectrometria de Massas

OV-1701 – 14% cianopropilfenil metilpolisiloxano

PA – Poliacrilato

PDMS – Polidimetilsiloxano

P.I. – Padrão Interno

PPY – Polipirrol

SPE – Extração em Fase Sólida

SPME – Microextração em Fase Sólida

UV – Detector de Ultravioleta

RESUMO

As recentes técnicas miniaturizadas de preparo de amostra, microextração em fase sólida (SPME) e “in tube” SPME, apresentam uma série de vantagens em relação aos métodos clássicos de extração (extração líquido-líquido e extração em fase sólida), tais como: não requer instrumentação analítica sofisticada, utilização de pequenas quantidades de solventes orgânicos, rápido processo operacional, permite automação das análises, a reutilização das fases extratoras, e integra em um único sistema a extração, concentração e introdução da amostra no cromatográfico.

Esta dissertação tem como objetivo a padronização, validação e comparação dos métodos SPME/LC-UV com dessorção “off line” e “in tube” SPME/LC-UV, para a análise dos antidepressivos da nova geração (*mirtazapina*, *citalopram*, *paroxetina*, *duloxetina*, *fluoxetina* e *sertralina*) em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica.

As variáveis: fase extratora, pH da matriz, tempo e temperatura de extração e de dessorção e força iônica apresentaram grande influência na eficiência do processo SPME. O método SPME/LC-UV padronizado, apresentou limite de quantificação (LQ) de 25 a 50 ng mL⁻¹, ampla faixa de linearidade (LQ – 500 ng mL⁻¹, $r^2 > 0,9970$) e precisão inter ensaios com coeficientes de variação menor que 15% para todos os analitos. Apesar das baixas taxas de recuperação obtidas, de 8,1% (citalopram) a 17,1% (mirtazapina), o método SPME/LC-UV apresentou seletividade e sensibilidade analítica adequada.

As variáveis: pH da matriz, fluxo e número de ciclos aspirar/dispensar e volume de amostra apresentaram grande influência na eficiência do processo “in tube” SPME. A etapa de precipitação de proteínas do plasma, anterior ao processo de extração, foi necessária para a eliminação dos compostos endógenos. O método “in tube” SPME/LC-UV padronizado apresentou seletividade adequada, precisão inter ensaios com coeficiente de variação menor que 10%, LQ de 20 a 50 ng mL⁻¹, linearidade na faixa de concentração do LQ a 500 ng mL⁻¹, com $r^2 > 0,9983$ para todos os analitos e recuperação absoluta de 5,32% (mirtazapina) a 43,5% (sertralina).

A técnica “in tube” SPME, quando comparada à SPME, permitiu a automação das análises, menor exposição do analista às amostras biológicas e solventes orgânicos, menor tempo de análise e menor volume de amostra de plasma.

A eficácia dos métodos, SPME/LC-UV e “in tube” SPME/LC-UV, foi comprovada através das análises de amostras de plasma de pacientes em terapia com os antidepressivos, para fins de monitorização terapêutica.

ABSTRACT

The recent miniaturized sample techniques preparation, solid phase microextraction (SPME) and in tube SPME, present several advantages when compared with classic extraction methods (liquid-liquid extraction and solid phase extraction), such as: it does not require sophisticated analytical instrumentation, use small organic solvent amounts, fast operational process, automation of the analyses, reuse extraction phases, and incorporates, into a single procedure, sample extraction, concentration and sample introduction.

The aim of this work is development, validation and comparison of methods SPME/LC-UV with off line desorption and in tube SPME/LC-UV, for analyses of antidepressants of the new generation (mirtazapine, citalopram, paroxetine, duloxetine, fluoxetine and sertraline) in plasma samples for therapeutic drug monitoring.

Variables: extraction phase, matrix pH, time and temperature of extraction and desorption and ionic strength showed great influence in SPME process efficiency. The method SPME/LC-UV presented limit of quantification (LOQ) variety from 25 to 50 ng mL⁻¹, wide range the of linearity (LOQ – 500 ng mL⁻¹, $r^2 > 0.9970$) and interassays precision with coefficient of variation lower than 15% for all analytes. Although the low recovery, from 8.1% (citalopram) to 17.1% (mirtazapine), the method SPME/LC-UV presented adequate selectivity and analytical sensitivity.

Variables: matrix pH, flow and number of aspirate/dispense cycles and sample volume showed great influence in the in tube SPME process efficiency. The protein precipitation of the plasma steps, previous to the extraction process, was necessary for the endogenous compounds elimination. The method in tube SPME/LC showed adequate selectivity, interassays precision with coefficient of variation lower than 10%, LOQ variety from 20 to 50 ng mL⁻¹, linearity in range concentration from LOQ to 500 ng mL⁻¹, with $r^2 > 0.9983$ for all analytes and recovery from 5.32% (mirtazapine) to 43.5% (sertraline).

The technique in tube SPME, compared with the SPME, permitted the automation of the analyses, minor exposition of the analyst to the biological samples and organic solvent, shorter analyses time and minor plasma sample volume.

The effectiveness methods, SPME/LC-UV and in tube SPME/LC-UV, was proven through the analyses of plasma samples of patients in therapy with antidepressants, for therapeutic drug monitoring.

1. INTRODUÇÃO

1.1. DEPRESSÃO ^{1,2}

A depressão é uma condição médica comum, crônica e recorrente; frequentemente associada à incapacitação funcional e ao comprometimento da saúde física. Os sintomas mais freqüentes estão relacionados à perda de apetite, do interesse sexual, insônia e diminuição da atividade motora. O paciente tem se mostrado inútil, abandonado, desesperado e incapacitado para enfrentar as dificuldades do cotidiano, além de uma maior utilização de serviços de saúde.

Nos anos 90, a depressão foi considerada como a quarta causa específica de incapacitação, quando utilizada uma escala global para comparação de várias doenças. Segundo estimativa para o ano 2020, a depressão será a segunda causa de incapacitação em países desenvolvidos e a primeira em países em desenvolvimento. Ainda considerando a incapacitação, a depressão, quando comparada às principais condições médicas, tem apresentado equivalência às doenças isquêmicas cardíacas graves.

Segundo estudos realizados em diferentes países ocidentais mostram que a depressão é um transtorno freqüente. A predominância anual na população tem atingido níveis de 3% a 11%, no entanto, em estudos realizados em populações específicas de pacientes, os resultados são superiores. Mais de 10% dos pacientes sob cuidados primários em saúde apresentaram sintomas de depressão, 22% a 33% dos pacientes internados com doença física, 33% em pacientes que apresentaram infarto recente, chegando a 47% nos casos de pacientes com câncer.

A depressão tem sido sub-diagnosticada e sub-tratada. Em torno de 50% a 60% dos casos de depressão não têm sido diagnosticados pelo clínico. Muitas vezes, os pacientes não recebem tratamento suficientemente adequado e específico. Os motivos para o sub-diagnóstico advêm de fatores relacionados aos pacientes e médicos, tais como: preconceito dos pacientes,

em razão do diagnóstico da doença, descrença do tratamento, falta de treinamento, específico dos clínicos, os quais têm reconhecido apenas os sintomas físicos e identificado os sintomas da depressão como “compreensível”. No entanto, 70% da morbi-mortalidade associada à depressão pode ser prevenida com tratamento adequado.

1.2. ANTIDEPRESSIVOS

O desenvolvimento, no final da década de 50, dos fármacos antidepressivos e sua utilização junto à prática clínica trouxeram um avanço importante no tratamento e no entendimento de possíveis mecanismos subjacentes aos transtornos depressivos. A depressão foi diagnosticada como uma doença passível de tratamento, semelhante a outras doenças como o diabetes e à hipertensão arterial.

Até os anos 80 havia duas classes de antidepressivos, os tricíclicos (ADTs) e os inibidores de monoaminoxidase (IMAOs). Embora muito eficazes e ainda muito utilizados, apresentam efeitos adversos indesejáveis causados pela inespecificidade de sua ação farmacológica e em casos de superdosagem, têm sido potencialmente letais. Aproximadamente 70% dos pacientes com depressão têm sido beneficiados com os ADTs, no entanto, cerca de 30% a 40% não são contemplados com a resposta clínica desejada, necessitando a associação de outra classe de antidepressivos, ou até mesmo eletroconvulsoterapia ².

Nas últimas duas décadas surgiram novas classes de antidepressivos, a partir da pesquisa de moléculas desprovidas dos efeitos adversos dos clássicos ADTs e IMAOs. Denominados antidepressivos da nova geração, ou antidepressivos não-tricíclicos, não-IMAO, atípicos, ou ainda, novos antidepressivos, os quais têm sido classificados em função da sua ação farmacológica, pois não compartilham estruturas comuns. Entre os antidepressivos da nova geração pode-se destacar os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (**ISRSs**), os

inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (**IRSNs**) e os noradrenérgicos e específicos serotoninérgicos (**ANES**).

1.2.1. INIBIDORES SELETIVOS DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA (ISRSs)

Os ISRSs: *citalopram*, *fluoxetina*, *paroxetina* e *sertralina* (Figura 1) apresentam eficácia clínica semelhante aos clássicos ADTs, mas destituídos dos efeitos anticolinérgicos (boca seca, constipação, visão turva, retenção urinária e toxicidade cognitiva) e cardiovasculares (aumento do ritmo cardíaco e diminuição na condução cardíaca) ³. Embora todos os ISRSs apresentem o mesmo mecanismo de ação, as diferenças entre as estruturas moleculares fazem com que os diferentes compostos apresentem distintos perfis farmacocinéticos. Todos os ISRSs apresentam alta ligação protéica (citalopram em menor grau). A fluoxetina apresenta metabólito com atividade clínica significativa (inibição da recaptação de serotonina e inibição de isoenzimas do citocromo P-450), a norfluoxetina ⁴.

As concentrações plasmáticas de sertralina e citalopram são proporcionais às doses administradas (farmacocinética linear), o que não ocorre com fluoxetina e paroxetina. Os ISRSs são rapidamente absorvidos, ligam-se às proteínas plasmáticas (alta porcentagem), todos deslocam outros fármacos da ligação protéica, aumentando seu nível plasmático. Metabolizados primariamente pelo fígado, todos os ISRSs afetam as enzimas metabolizadoras do citocromo P-450 (em menor proporção, a sertralina) e podem comprometer o metabolismo de outros fármacos metabolizados por este sistema.

As concentrações plasmáticas terapêuticas recomendadas têm sido de 15 a 1000 ng mL⁻¹ para fluoxetina, 50 a 500 ng mL⁻¹ para a sertralina, 20 a 500 ng mL⁻¹ para a paroxetina e 25 a 550 ng mL⁻¹ para o citalopram ⁴. No entanto, estes intervalos terapêuticos não encontram-se claramente definidos, e muitos estudos com os ISRSs mostram que as concentrações plasmáticas variam de 50 a 200 ng mL⁻¹ ⁵.

1.2.2. ANTIDEPRESSIVO NORADRENÉRGICO E ESPECÍFICO SEROTONINÉRGICO (ANES) – MIRTAZAPINA

A *mirtazapina* (Figura 1), antidepressivo tetracíclico, aumenta a transmissão noradrenérgica através do antagonismo de receptores α -2 (pré-sinápticos) no sistema nervoso central, ao mesmo tempo em que modula a função central da serotonina por interação com os receptores 5-HT₂ e 5-HT₃. A atividade antagonista nos receptores histaminérgicos H₁ da mirtazapina é responsável por seus efeitos sedativos, embora esteja praticamente desprovida de atividade anticolinérgica. Tonteiras e sedação são os efeitos adversos mais frequentes, embora, secura da boca, aumento do apetite e do peso, sonolência e prisão de ventre sejam observados em alguns pacientes, após algumas semanas do uso contínuo do medicamento. Sob uma visão geral, a mirtazapina apresenta menos efeitos adversos que os ADTs. Apresenta alta ligação às proteínas plasmáticas (85%). O pico de concentração plasmática é atingido em cerca de duas horas e o estado de equilíbrio em cinco dias, apresentando relação linear com a dose administrada. Seus metabólitos são ativos, encontrados em níveis baixos e sua meia-vida de eliminação é de 20 a 40 horas (mais longa em mulheres). Os metabólitos são eliminados na urina (75%) e nas fezes (15%) ⁶.

1.2.3. ANTIDEPRESSIVO INIBIDOR DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA E NORADRENALINA (IRSN) – DULOXETINA

A duloxetina (Figura 1), antidepressivo eficaz recentemente desenvolvido, bloqueia fortemente a recaptação de serotonina e noradrenalina e fracamente a captação de dopamina, com baixa ou nenhuma afinidade aos receptores dopaminérgicos, histaminérgicos,

colinérgicos e adrenérgicos, As principais vantagens deste fármaco, quando comparado aos ISRSs, têm sido a eficácia terapêutica em menor intervalo de tempo e diminuição dos efeitos adversos.

A duloxetina apresenta eficaz absorção pelo organismo, atingindo concentrações plasmáticas máximas em cerca de 6 horas, é altamente ligada às proteínas (> 90%) e, depois de metabolizada, é excretada principalmente na urina, junto com seus metabólitos, após aproximadamente 12 horas⁷.

Por se tratar de um fármaco muito recente, ainda não existem estudos referentes às concentrações plasmáticas terapêuticas recomendadas de duloxetina.

MIRTAZAPINA

CITALOPRAM

PAROXETINA

DULOXETINA

FLUOXETINA

SERTRALINA

Figura 1. Estruturas dos antidepressivos da nova geração.

1.3. MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA ^{8,9}

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

O objetivo da monitorização terapêutica é assegurar a eficácia e minimizar os efeitos adversos dos fármacos, prescritos na clínica. Os fármacos monitorados são aqueles que apresentam intervalos terapêuticos bem estabelecidos, ou seja, a maioria dos pacientes, que apresentam concentrações plasmáticas dentro deste intervalo fixo, tem as desordens psiquiátricas mantidas sob controle e efeitos adversos aceitáveis. A monitorização terapêutica também pode ser 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 indicada em situações onde a eficácia do medicamento é questionada, quando o paciente exibe toxicidade provavelmente relacionada ao fármaco, quando há suspeita de não aderência do paciente ao regime de dosagem estabelecido, nas situações de interações de fármacos, nas patologias associadas, em situações de mudanças na formulação, ou ainda quando a condição do paciente é refratária ao regime de dosagem convencional.

1.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

A determinação de fármacos em amostras biológicas, principalmente no plasma de pacientes, coletadas com base no contexto clínico e nos princípios da farmacocinética, tem sido um procedimento usual na área clínica, para assegurar a eficácia terapêutica e minimizar os efeitos adversos (sintomas de toxicidade) dos fármacos prescritos ¹⁰.

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

Os métodos convencionais, empregados no preparo de amostras biológicas para análises de antidepressivos por técnicas cromatográficas, têm sido a extração líquido-líquido e extração em fase sólida ¹¹⁻¹⁴.

A técnica de extração líquido-líquido (**LLE**) apresenta desvantagens, tais como consumo de solventes orgânicos de alta pureza, exposição do analista a compostos tóxicos, requer a concentração da fase orgânica, várias etapas para sua execução e formação de emulsão entre as fases, o que resulta na perda do analito.

A extração em fase sólida (**SPE**) apresenta uma grande variedade de fases extratoras, resultando em diferentes tipos de interações com os analitos. Este fato favorece a seletividade analítica, possibilitando a automação das análises e o acoplamento em linha com técnicas cromatográficas. Entretanto, tem apresentado algumas limitações como o bloqueio dos poros da fase extratora pelos componentes da matriz biológica, utilização de solventes orgânicos para a eluição, variações analíticas entre cartuchos extratores e várias etapas operacionais para sua execução.

1.4.1. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

A microextração em fase sólida (SPME), introduzida por Pawliszyn e colaboradores em 1990, apresenta uma série de vantagens em relação aos métodos de extração anteriormente referidos: não requer instrumentação analítica sofisticada, não utiliza solvente orgânico (cromatografia gasosa, GC) ou pequena quantidade de solvente orgânico (cromatografia líquida, LC), rápido processo operacional, permite automação das análises, a reutilização das fibras extratoras, e integra em um único sistema a extração, concentração e introdução da amostra no cromatográfico ^{15,16}. Consiste de um amostrador (uma espécie de seringa) com uma fibra de sílica fundida revestida com um fino filme de um polímero ou de um sólido adsorvente (fase extratora), Figuras 2 e 3.

Figura 2. Dispositivo da fibra de SPME: (A) Posição com a fibra retraída na agulha (tubo com diâmetro externo 0,56 mm), (B) Posição com a fibra exposta ¹⁷.

Figura 3. Dispositivo comercial para SPME: 1: Fibra extratora, 2: Agulha de aço, 3: Corpo do aplicador, 4: Septo de silicone, 5: Guia do aplicador, 6: Guia do êmbolo, 7: Êmbolo.

A SPME é baseada no equilíbrio de partição do analito entre as fases: aquosa (amostra homogênea), polimérica extratora (fibra) e gasosa ^{15, 16, 18, 19}. Durante a extração em um sistema trifásico, considerado ideal, os analitos migram entre as três fases até que o equilíbrio de partição seja atingido. Desta forma, a massa extraída do analito pela fibra está relacionada ao equilíbrio de massas nas fases do sistema. A massa total do analito deverá permanecer constante durante a extração, podendo ser expressa pela equação 1:

$$C_0 V_s = C_f^e V_f + C_h^e V_h + C_s^e V_s \quad \text{Equação 1}$$

onde C_0 indica a concentração inicial do analito na amostra, C_f^e , C_h^e , C_s^e as concentrações no estado de equilíbrio nas fases polimérica, gasosa e na aquosa (amostra), respectivamente. V_f , V_h , V_s os volumes das fases polimérica, gasosa e aquosa, respectivamente ^{15, 16, 18, 19}.

Se as constantes de partição (K) do analito entre as fases polimérica/gasosa e gasosa/aquosa forem definidas como:

$$K_{fh} = C_f^e / C_h^e \quad K_{hs} = C_h^e / C_s^e$$

e a massa do analito absorvido ou adsorvido na fase extratora por:

$$n = C_f^e V_f$$

a quantidade de analito extraído (número de mols) após atingir o equilíbrio do sistema poderá ser expresso através da equação 2:

$$n = \frac{K_{fh} K_{hs} V_f V_s C_o}{K_{fh} K_{hs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \quad \text{Equação 2}$$

A quantidade de analito absorvido ou adsorvido pela fibra está linearmente relacionada com a concentração inicial do analito na amostra, permitindo assim, a análise quantitativa^{16, 18, 19, 20}.

A extração pode ser realizada pela exposição da fibra (fase extratora) diretamente na amostra, ou na fase gasosa (“headspace”) ^{15, 16}. Em análises realizadas por cromatografia gasosa (SPME-GC), o processo SPME tem sido realizado segundo o seguinte procedimento: com a fibra retraída no injetor da agulha do dispositivo SPME, o septo do frasco da amostra é perfurado e a fibra exposta à amostra (modo direto ou headspace) – Figura 4a. Após atingir o equilíbrio de partição do analito entre as fases (aquosa, polimérica e gasosa), a fibra é novamente retraída para o interior da agulha e esta é retirada do frasco. A agulha do dispositivo SPME é inserida no injetor GC adequadamente aquecido e então a fibra é exposta para dessorção térmica (Figura 4b). Após as extrações é recomendável vedar a agulha com septo, para evitar contaminações da fibra. Este procedimento permite também a coleta da amostra em locais distantes e transporte do dispositivo SPME para o laboratório.

A técnica SPME-GC, inicialmente desenvolvida para a análise de poluentes em amostras de água ^{18 – 22}, tem sido empregada com êxito na extração de fármacos voláteis e semivoláteis em análises de amostras biológicas ^{23, 24}, principalmente quando analisados no

modo “headspace”¹⁵, onde não ocorre a interação das proteínas do plasma com a fibra. Já os fármacos menos voláteis ou termicamente instáveis têm sido analisados após processos de derivação/SPME-GC ou empregando a técnica SPME-LC.

Figura 4. Processo de extração SPME (a), dessorção térmica dos analitos extraídos para a análise por GC (b) e dessorção na interface LC (c)²¹.

O acoplamento com SPME/LC requer uma interface apropriada, em forma de um T (Figura 4c), onde a fibra é inserida na extremidade superior e as demais extremidades, lateral e inferior, são conectadas à válvula seis pórticos do LC. A dessorção dos analitos poderá ser realizada no modo dinâmico, com a fase móvel, ou modo estático, quando os analitos são fortemente absorvidos pela fibra. Neste último modo, a fibra, anterior a eluição dos analitos para a coluna cromatográfica, permanece na interface em contato com um volume predeterminado de fase móvel ou de solvente orgânico, durante um intervalo de tempo, para dessorção dos analitos²⁶⁻²⁷.

Figura 5. Interface SPME-LC: a) modo estático e b) modo dinâmico ²⁸.

O acoplamento SPME-LC apresenta algumas limitações, tais como: requer uma interface apropriada, dificuldades no acoplamento da interface-LC, dessorção não eficiente dos compostos adsorvidos pela fibra, análise manual, número limitado de fibras adequadas para análise de fármacos, principalmente os básicos e polares, e baixa estabilidade destas fibras em fase móvel ou em solventes orgânicos. Por isso, tem-se observado um número limitado de publicações relativas à análise de fármacos semi ou não voláteis por SPME-LC (Tabela 1).

Tabela 1. Alguns trabalhos da literatura utilizando o método SPME/LC para análise de fármacos.

Fármacos	Método de Extração	Sistema Analítico	LD e/ou LQ	Referência
Anticonvulsivantes	Direto CW/TPR-100 µm	LC - UV	LQ = 0,05 a 1,0 µg mL ⁻¹	Queiroz <i>et al.</i> , 2002 (29)
Ac. Micofenólico (Imunossupressor)	Direto CW/TPR – 100 µm	LC - UV	LD = 0,05 µg mL ⁻¹ LQ = 0,12 µg mL ⁻¹	Zambonim <i>et al.</i> , 2004 (30)
Benzodiazepínicos	Direto ADS	ADS - SPME LC - MS	LD = 20 a 35 µg mL ⁻¹	Walles <i>et al.</i> , 2004 (26)
Naproxen (Anti-inflamatório)	Direto CW/TPR – 100 µm	LC – UV	LD = 0,03 µg mL ⁻¹ LQ = 0,20 µg mL ⁻¹	Aresta <i>et al.</i> , 2005 (31)
Anfetaminas	Direto PDMS – 7 e 100 µm PDMS/DVB – 65 µm CW/TPR – 50 µm CW/DVB – 75 µm	LC - ESI - MS/MS	LD = 0,03 a 0,4 µg L ⁻¹	Chou e Lee, 2005 (32)
Fenotiazina (Anti-psicótico)	—	LC - ESI - MS/MS	—	Maurer, 2005 (33)
Ibuprofen (Anti-inflamatório)	Direto PDMS – 60 µm PA – 85 µm CW/TPR – 50 µm	LC - UV	LQ = 0,25 µg mL ⁻¹	de Oliveira <i>et al.</i> , 2005 (34)
Vários fármacos	Direto PDMS – 100 µm PA – 85 µm	LC – UV	—	Theodoridis <i>et al.</i> , 2006 (35)

LD = limite de detecção, LQ = limite de quantificação, PDMS = polidimetilsiloxano, PA = poliacrilato, DVB = divinilbenzeno, CW = carbowax, ADS = Alquil-diol sílica, ESI = ionização por eletro-spray, MS = espectrometria de massas.

Para superar estes problemas, Lanças e colaboradores desenvolveram uma nova interface, munida de um sistema de aquecimento que propicia eficiente dessorção dos analitos e diminuição do “carryover”, resultando em maior sensibilidade analítica ³⁶.

Queiroz e colaboradores ²⁹ descreveram um simples sistema SPME/LC com dessorção “off line”, o qual não requer a utilização de interface, para a determinação simultânea de lamotrigina, carbamazepina e 10, 11 epóxido carbamazepina em amostras de plasma. A Figura 6 ilustra o processo de dessorção “off line”.

O desenvolvimento do processo SPME inclui a otimização das seguintes variáveis: fase extratora (fase estacionária) temperatura e tempo de extração e dessorção, pH da matriz e força iônica.

Figura 6. Processo de dessorção “off line” SPME.

1.4.1.1. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO SPME

Fase extratora

A natureza química do analito determina o tipo de fase polimérica a ser utilizada. A simples regra “similar solubiliza similar”, pode ser aplicada para as fases líquidas. A seleção da fibra tem sido baseada principalmente na polaridade, massa molar e volatilidade do analito ^{15, 16, 18, 19}.

A espessura do filme da fase extratora e a constante de partição determinam a eficiência e tempo de extração. O filme mais espesso apresenta maiores taxas de extração, no entanto, requer maior tempo para atingir o equilíbrio de partição. Quanto maior a afinidade do analito com a fibra, maior será o coeficiente de partição, com isto maior a eficiência do processo SPME ^{15, 16, 18, 19}.

O revestimento mais utilizado tem sido o PDMS (polidimetilsiloxano), revestimento líquido de alta viscosidade e estabilidade. Já o poliacrilato (PA) é um sólido que pode liquefazer em altas temperaturas. Tanto o PDMS, quanto o PA, extraem analitos baseado no processo de absorção. Os demais revestimentos: PDMS-DVB (polidimetilsiloxano divinilbenzeno), CW-DVB (carbowax divinilbenzeno), CW-TR (carbowax/resina TPR-100 suportada) e carboxen são na maioria revestimentos mistos, onde a fase mais superficial é um sólido poroso. Nestes revestimentos predomina-se o processo de adsorção. A semelhança entre os processos de extração (adsorção e absorção) está no fato de que, em ambos, as moléculas do analito migram para a fase extratora através do processo de difusão. Entretanto, no processo de absorção, os analitos atravessam a superfície do revestimento e difundem no mesmo durante a extração, enquanto que, na adsorção, os analitos permanecem na superfície do sólido ³⁷. A Tabela 2 apresenta as fibras disponíveis no comércio para SPME.

Tabela 2: Fibras de SPME disponíveis no comércio ³⁸.

Tipo	Fase extratora	Espessura do filme	Aplicação
Apolar	PDMS	7, 30 e 100 μm	Compostos apolares e voláteis.
Polar	PA	85 μm	Compostos de média à alta polaridade (álcoois, cetonas e fenóis). Voláteis de média à alta polaridade.
	CW-DVB	65 μm	
Mista (Bi-polar)	PDMS-DVB	65 μm	Voláteis e não-voláteis de baixa à alta polaridade.
	Carboxen-DVB	75 μm	

PDMS: polidimetilsiloxano; PA: poliacrilato; CW-DVB: carbowax divinilbenzeno; PDMS-DVB: polidimetilsiloxano divinilbenzeno.

Outra diferença significativa entre os processos de extração é que, o processo de absorção não é competitivo, ou seja, a presença de outros compostos na matriz geralmente não afeta a extração. Já nos revestimentos onde o processo baseia-se na adsorção, pode ocorrer competição entre o analito de interesse e interferentes, diminuindo a quantidade de analito extraída e dificultando uma resposta linear em uma ampla faixa de concentração ³⁷. Quando todos os sítios ativos da fase extratora forem ocupados, os analitos que apresentam maior afinidade pela mesma podem deslocar da superfície, os analitos que apresentam menor afinidade (Figura 7).

Figura 7. Efeito do deslocamento dos analitos da fase extratora através da diferença de afinidade ³⁹.

Temperatura de extração ^{37, 39, 40}

A variação da temperatura de extração tem grande efeito sobre a microextração. Com o aumento da temperatura, o coeficiente de difusão do analito aumenta e o coeficiente de partição do mesmo para a fase extratora diminui. Tais variações nos coeficientes de difusão e de partição terão influências opostas sobre a extração: em decorrência do aumento do coeficiente de difusão, o tempo requerido para que o analito atinja o equilíbrio de sorção deverá ser menor. Por outro lado, devido à diminuição do coeficiente de partição, a quantidade de massa extraída no equilíbrio de sorção será menor, acarretando em perda da eficiência do processo.

O aumento da temperatura também diminui a viscosidade dos fluidos biológicos, fato importante quando trabalha-se com plasma, pois este apresenta maior viscosidade, quando comparado com a água ou urina.

Tempo de extração ^{37, 39, 40}

O tempo de extração é otimizado considerando o equilíbrio de sorção. O equilíbrio de sorção será atingido quando não houver aumento significativo na massa extraída, com o aumento do tempo de extração. Este é dependente do processo de agitação, assim como da constante de distribuição do analito entre o revestimento da fibra e a amostra. Quanto maior for a constante de distribuição e a espessura da fase extratora, maior será o tempo requerido para atingir o equilíbrio de sorção.

Em alguns casos, principalmente em análises de amostras biológicas, quando o tempo de extração necessário para alcançar o equilíbrio é alto, a microextração tem sido realizada fora do equilíbrio de sorção. Neste caso, o controle das variáveis SPME deverá ser rigorosamente controlado, recomendando-se o uso do padrão interno, que compensará possíveis erros, devido às variações no tempo de extração.

pH da matriz ^{37, 39, 40}

O pH da amostra é importante para a extração de analitos que possuem grupos dissociáveis, dependentes do pH do meio. Somente as formas não-dissociadas dos analitos são extraídas pelos revestimentos SPME. O pH da amostra tem sido controlado por uma solução tampão, onde a maioria dos analitos dissociados passará à forma não-dissociada, favorecendo o processo de extração. Em uma mistura tamponada, o processo SPME apresenta maior eficiência e linearidade quando comparada à uma mistura não tamponada, pois a razão entre as formas não-dissociadas e dissociadas permanece constante. Os analitos básicos, como os antidepressivos, têm sido analisados em pH básico e analitos ácidos, como os clorofenóis, têm sido extraídos em pH ácido.

Quando a SPME é realizada no modo direto, alguns cuidados devem ser tomados no controle do pH, pois, valores de pH extremos (menor que 2 e maior do que 11) podem danificar o revestimento da fibra ⁴¹.

Força iônica ^{37, 39, 40}

A adição de sal (aumento da força iônica) poderá contribuir para o aumento das taxas recuperação do processo SPME. O cloreto de sódio (NaCl) tem sido usado para este fim. Inicialmente, observa-se um aumento no rendimento da extração, com o aumento da concentração de sal, no entanto, após o máximo deste rendimento, o acréscimo de sal provocará uma diminuição da massa extraída.

Este fato pode ser explicado levando em consideração dois processos que ocorrem simultaneamente. Primeiramente, o acréscimo da massa extraída de analito é resultante do efeito “salting out”, onde moléculas de água formam uma esfera de hidratação, em torno das moléculas iônicas do sal, reduzindo as moléculas de água disponíveis para solubilizar os analitos na amostra; desta forma, uma quantidade maior do analito migra para a fase extratora. Por outro lado, os analitos polares podem participar de interações eletrostáticas com as moléculas de sal, reduzindo a difusão destes para a fase extratora.

Dessorção

Após a extração, os analitos são transferidos para o instrumento analítico onde ocorre a dessorção, separação e quantificação. Durante a dessorção os analitos difundem-se do filme polimérico para o fluido de arraste. Portanto, as variáveis como tempo e temperatura de dessorção deverão ser otimizadas para eliminar o efeito de “carryover” (efeito de memória).

Os processos de dessorção em CG e em LC (modo estático, dinâmico e “off line”) foram descritos no item 1.4.1.

Agitação

A cinética relacionada ao processo de difusão dos analitos, da matriz biológica à fase extratora, mostrou-se relevante no processo SPME. No modo direto, a fibra é inserida diretamente na matriz aquosa e a agitação da amostra, durante o processo SPME, é requerida para reduzir o “efeito da camada estática”. O fluido biológico em contato com a fibra encontra-se estacionário e, à medida que a distância em relação à superfície da fibra torna-se maior, o movimento do fluido gradualmente aumenta, até igualar-se ao da maioria da amostra^{15, 16, 18, 19}. Esta região, camada estática, é denominada de camada limite de Prandtl, o qual tem sido determinada pelas condições de agitação e viscosidade do fluido, ou seja, o aumento da agitação acarreta na diminuição da camada estática, resultando em aumento do processo de difusão e diminuição do tempo necessário para atingir o equilíbrio de sorção^{15, 16, 18, 19}.

1.4.2. “in tube” SPME

Um novo sistema SPME/LC (microextração em fase sólida acoplada ao LC), denominado “**in-tube**” SPME, foi recentemente desenvolvido para a microextração e pré-concentração de fármacos menos voláteis e/ou termicamente instáveis. Utiliza um tubo capilar aberto de sílica fundida (dispositivo SPME), com a superfície interna revestida com fase estacionária, o qual tem sido acoplado em linha com o sistema LC. Esta técnica permite automação do processo de extração, resultando em maior precisão e menor tempo de análise, quando comparado às técnicas “off-line”. Como as amostras biológicas são injetadas no sistema, praticamente em seu estado fisiológico, diminui a exposição dos analitos a estas amostras, além de minimizar perdas do analito durante o processo de extração.

O sistema “in tube” SPME/LC pode ser montado, fixando-se uma coluna capilar entre a alça de amostragem e a agulha do injetor automático do LC, ou mesmo substituindo-se a alça

de amostragem. O injetor automático aspira a amostra do frasco e transporta a mesma para o capilar a uma velocidade linear constante. O volume de amostra aspirado é dispensado novamente no frasco do injetor. Estas etapas são referidas como ciclos aspirar/dispensar, as quais têm sido executadas repetitivamente segundo programas do injetor automático. Na coluna capilar ocorre o processo de partição do analito com a fase estacionária, até que o equilíbrio seja atingido. O equilíbrio de partição tem sido rapidamente atingido, pois a extração é realizada sob agitação pelo fluxo da amostra, entrando e saindo da coluna capilar. Durante o processo de extração, a válvula do injetor LC deverá estar na posição carregar (Figura 9a). O capilar tem sido lavado e condicionado antes do processo de extração com solução de metanol/água ou com a fase móvel.

Os analitos extraídos são dessorvidos rapidamente do revestimento do capilar pelo fluxo da fase móvel ou pela adição de um solvente orgânico, após posicionar a válvula do injetor LC na posição injetar (Figura 9b). Os analitos dessorvidos são transferidos para a coluna analítica do LC para separação e detecção em UV ou MS. Desta forma, a técnica “in-tube” SPME não necessita de uma interface especial SPME/LC para dessorção dos analitos.

Figura 9. Sistema de extração “in tube” SPME/LC ⁴².

A Tabela 3 ilustra alguns trabalhos utilizando o método “in tube” SPME/LC para análise de fármacos em amostras biológicas.

Tabela 3: Aplicações da técnica “in tube” SPME na análise de fármacos em amostras biológicas.

Fármacos	Matriz	Ciclos, volume e fluxo de amostra	Capilar	Deteção (LD)	Referências
Anfetaminas	Urina	15 ciclos, 35 µL Fluxo: 100 µL min ⁻¹	Omegawax 250	LC-MS (0,3 - 0,8 ng mL ⁻¹)	Kataoka <i>et al.</i> 2000 (43)
Benzodiazepínicos	Soro e Urina	10 ciclos, 30 µL Fluxo: 0,3 mL min ⁻¹	Supel-Q PLOT	LC-MS (0,02 – 2,0 ng mL ⁻¹)	Yuan <i>et al.</i> 2000 (44)
Antidepressivos	Urina	Fluxo: 80 µL min ⁻¹	HM / DB-5	CE-UV (44 - 153 ng mL ⁻¹)	Jinno <i>et al.</i> 2001 (45)
Verapamil e metabólitos	Plasma e Urina	40 ciclos, 30 µL Fluxo: 100 µL min ⁻¹	Polímero PPY	LC-MS (5-8 ng mL ⁻¹)	Walles <i>et al.</i> 2002 (46)
Benzodiazepínicos	Plasma	4 ciclos, 20 µL Fluxo: 15 µL min ⁻¹	RAM/ADS	UV (24 – 29 ng mL ⁻¹)	Mullett <i>et al.</i> 2002. (47)
Ranitidina	Urina	10 ciclos, 30 µL Fluxo: 100 µL min ⁻¹	Omegawax 250	LC-MS (10 ng mL ⁻¹)	Kumazawa <i>et al.</i> 2003 (48)
Derivados de Xantina	Soro	Fluxo: 40 µL min ⁻¹	Poli (MAA-EGDMA) monolítico	LC-UV (6,5 – 12 ng mL ⁻¹)	Fan <i>et al.</i> 2004 (49)
ARA-IIIs	Plasma, Urina	Fluxo: 40 µL min ⁻¹	Poli (MAA-EGDMA) monolítico	LC-UV - DAD - FLD (0,1 - 15,3 ng mL ⁻¹)	Nie <i>et al.</i> 2005 (50)
Alcalóides	Plasma	Fluxo: 40 µL min ⁻¹	Poli (MAA-EGDMA) monolítico	LC-UV –DAD – FLD (1,79 – 2,62 ng mL ⁻¹)	Wen <i>et al.</i> 2005 (51)
Anfetaminas	Urina	Fluxo: 40 µL min ⁻¹	Poli (MAA-EGDMA) monolítico	LC-UV (1,4 – 4,0 ng mL ⁻¹)	Fan <i>et al.</i> 2005 (52)
Anfetaminas	Urina	Fluxo: 40 µL min ⁻¹	Poli (MAA-EGDMA) monolítico	CE-UV (1,79 – 2,62 ng mL ⁻¹)	Wei <i>et al.</i> 2005 (53)
Antinflamatórios	Urina	Fluxo: 500 µL min ⁻¹	β- ciclodextrina	LC-UV (18 – 38 ng mL ⁻¹)	Fan <i>et al.</i> 2005 (54)

PPY: polipirrol. HM: fibra de Zilon. RAM/ADS: acesso à material restrito / alquil diol silica. Benzodiazepínicos: clonazepam, axazepam, temazepam, nordazepam, diazepam. CE: eletroforese capilar. FLD: detector de fluorescência. Antidepressivos: desipramina, nortriptina, imipramina e amitriptilina. ARA-IIIs (receptor antagonista de angiotensina II): candesartam, losartam, irbesartam, valsartam, telmisartam. Poli (MAA-EGDMA) monolítico: poli (metacrilato ácido-etileno glicol dimetacrilato) monolítico. Alcalóides: camptotecina, 10-hidroxicamptotecina. Derivados de Xantina: teobromina, teofilina e cafeína. Anfetaminas: Anfetamina,

metanfetamina, 3,4-metileno-dioxo-anfetamina, 3,4-metileno-dioxo-metilanfetamina. Antiinflamatórios: ibuprofeno, cetoprofeno e fenbufeno.

Para evitar a presença de partículas, no transporte das amostras biológicas ao longo do capilar, as proteínas têm sido removidas através de diluição e filtragem em micro filtro com poros de 0,25-0,45 μm ⁵⁵, em micro concentrador a 10000 g por 20 min⁴³, ou pela precipitação com solventes orgânicos⁴⁶.

A eficiência da extração SPME tem sido determinada através da quantidade de analito extraída pelo revestimento. Para as fases estacionárias que extraem os analitos baseados no processo de absorção, a quantidade de analito extraído pode ser expressa segundo a equação 3:

$$n_A = K_A V_f V_s C_A^o / (K_A V_f + V_s) \quad \text{Equação 3}$$

Onde n_A representa a quantidade de analito A extraído pela fase estacionária quando estabelecido o equilíbrio de partição entre as fases, V_f e V_s os volumes do revestimento da fibra e de solução de amostra, respectivamente; C_A^o a concentração inicial de analito na amostra, e K_A o coeficiente de partição.

O tempo requerido para atingir o equilíbrio de partição do analito entre as fases durante o processo “in tube” SPME pode ser expresso segundo a equação 4.

$$t_e = L [1 + K_A \times (V_f/V_v)] / \mu \quad \text{Equação 4}$$

Onde L representa o comprimento do capilar, K_A : coeficiente de partição, V_f : volume do revestimento da fibra, V_v : volume livre do capilar, μ : velocidade do fluxo do fluido biológico. Durante as extrações SPME as dimensões físicas: L , V_f , V_v e o valor K_A são fixos; desta forma, o tempo de extração depende da velocidade do fluxo do fluido.

Para obtenção de eficiente processo “in tube” SPME-HPLC, as variáveis: comprimento e fase estacionária do capilar, volume e ciclos de amostra aspirada/dispensada e velocidade do fluxo da amostra deverão ser otimizadas.

1.4.2.1 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO “in tube” SPME

Seleção da coluna capilar

Várias colunas capilares encontram-se disponíveis no comércio com diferentes fases estacionárias, diâmetros internos, comprimentos e espessuras de filme. A seleção da fase estacionária baseia-se na regra “similar solubiliza similar”. Por exemplo: em coluna de baixa polaridade, como a fase líquida polidimetilsilicone, compostos hidrofóbicos são retidos de forma seletiva; no entanto, compostos hidrofílicos apresentam maior afinidade com a fase polietileno glicol (maior polaridade).

O diâmetro interno, comprimento e espessura do filme do capilar estão linearmente relacionados com a quantidade de analitos extraídos, no entanto, o aumento das variáveis descritas pode causar picos largos, com cauda e dessorção não quantitativa dos analitos. Na maioria das análises têm-se utilizado colunas capilares de 50 a 60 cm de comprimento, com finos filmes, as quais têm resultado em extrações eficientes, cromatogramas bem definidos e ausência de “carryover”.

Embora colunas capilares com fase líquida quimicamente ligada ou “cross-linked” sejam estáveis na presença de água ou solventes orgânicos, estas podem ser facilmente deterioradas por ácidos inorgânicos ou bases fortes. Desta forma, torna-se necessário a avaliação da estabilidade da fase estacionária, quando exposta à fase móvel durante o processo de dessorção. Como exemplo, a coluna Omegawax 250 foi utilizada em mais de 500 extrações sem alteração da eficiência nas extrações de anfetaminas³⁹, antihipertensivos⁵⁶ e ranitidina⁵⁷.

Wu *et al.* ⁵⁵ desenvolveram um novo capilar de sílica fundida revestido com o polímero de polipirrol (PPY). Este polímero, quando comparado com fases estacionárias utilizadas em capilares comerciais, apresentou extrações mais eficientes, para as análises de anfetaminas em amostras de urina e cabelo ⁵⁵, β -bloqueadores na urina e soro ⁵⁸ e verapamil e principais metabólitos em várias matrizes biológicas, como plasma, urina e cultura de célula ⁴⁶. O capilar PPY mostrou-se estável nas condições de análise permitindo a utilização em centenas de determinações.

Para a análise de compostos benzodiazepínicos foi utilizada a coluna Supel-Q PLOT revestida com o polímero divinilbenzeno ⁴⁴, já o capilar RAM-ADS (acesso à material restrito – alquil diol sílica) foi utilizado na análise de compostos benzodiazepínicos em amostras de soro ⁴⁷, permitindo o fracionamento simultâneo das proteínas do soro e dos analitos hidrofóbicos.

Recentemente, Mullet *et al.* ⁵⁹ desenvolveram um capilar utilizando um tubo PEEK (polieter éter cetona) empacotado com partículas MIP (polímeros molecularmente impressos) para a análise de propanolol. Os capilares com fase extratora monolítica também têm sido utilizados para análises de alcalóides em plasma ⁵¹ e anfetaminas em urina ^{52,53}.

Efeito das modificações da amostra

As fases estacionárias dos capilares, em sua grande maioria, não são trocadoras de íons; extraem somente espécies quimicamente neutras presentes na amostra. Os ácidos fracos e bases poderão ser convertidos a sua forma neutra, na qual poderão ser extraídos. Para assegurar-se que 99% dos compostos ácidos, presentes em uma amostra, possam ser convertidos para a forma neutra, o pH deverá ter valor, no mínimo, duas unidades abaixo do pKa do analito. Para os analitos básicos, o pH deverá ter valor, no mínimo duas unidades acima do pKb do analito.

Wu *et al.* ⁵⁸ obtiveram eficiente extração de β -bloqueadores, fármacos básicos, em pH 8,5 (Tampão tris-HCl, 100mM) e em solução saturada com NaCl.

A eficiência da extração de anfetaminas (pKa 9,5-10,0), quando utilizado o capilar PPY, foi linearmente correspondente a concentração de NaCl e pH da amostra (3,0-10,0) ⁵⁵. O revestimento do capilar PPY e as anfetaminas (em baixos valores de pH) encontram-se positivamente carregados, resultando em repulsão eletrostática entre os analitos e revestimento da fibra, já em altos valores de pH as cargas positivas dos analitos são reduzidas e interações intermoleculares são observadas entre PPY e analitos, aumentando, desta forma, a eficiência do processo “in tube” SPME. Para a análise de verapamil e metabólitos ⁴⁶ (pKa 9,0 – 10,0), o pH 7,0 apresentou os melhores resultados.

Embora o efeito “salting out” aumente a eficiência do processo “in tube” SPME, poderá causar obstrução do capilar através da deposição do sal. A presença de solventes hidrofílicos na amostra diminui a eficiência da extração, pois aumenta a solubilidade dos analitos na mesma. A eficiência da extração não tem sido influenciada por adições de metanol em concentrações iguais ou menores a 5%. Na análise de benzodiazepínicos em amostras de soro, 5% de metanol foi adicionado às amostras para liberação das proteínas ligadas aos fármacos ⁴⁷.

Efeito do volume e número de ciclos de amostra aspirada/dispensada

O volume e número de ciclos de amostra aspirada/dispensada estão linearmente relacionados com a capacidade do capilar e quantidade de analito extraído.

Uma coluna capilar de 60 cm de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno apresenta capacidade de 29,4 μ L, já da agulha de injeção (10 μ L) à extremidade final da coluna, a capacidade resultante será de 39,4 μ L. O volume de amostra aspirada/dispensada tem sido de 30 a 40 μ L com velocidade linear de 50 a 100 μ L min⁻¹. Abaixo desta velocidade, a extração

requer longo tempo de análise e valores acima dos mencionados poderão ocasionar a formação de bolhas ao longo do capilar, reduzindo a eficiência da extração.

Em condição ideal, a amostra deverá ser aspirada/dispensada até atingir o equilíbrio de sorção dos compostos com a fase estacionária. Este equilíbrio tem sido avaliado através de gráficos do rendimento da extração *versus* número de ciclos de amostra aspirada/injetada. No entanto, quando alta sensibilidade analítica não é requerida, extrações fora do equilíbrio têm sido realizadas com o objetivo de diminuir o tempo de análise.

A extração de verapamil e metabólitos ⁴⁶ foi realizada em capilar PPY com 40 ciclos de 30 μL amostra e velocidade linear de 100 $\mu\text{L min}^{-1}$. O aumento da velocidade linear de 35 a 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ resultou em extrações mais eficientes em menor tempo de análise ⁴⁶, já Mullett *et al.* ⁵⁹ observaram que a diminuição da velocidade linear de fluxo de 100 para 50 $\mu\text{L min}^{-1}$, durante 10 ciclos, resultou no aumento de eficiência do processo SPME, nas análises de propanolol em amostras de soro. A diminuição da velocidade desta extração aumentou a transferência de massa do analito para os sítios de adsorção do capilar MIP.

Para a extração de β -bloqueadores em amostras de urina e soro, 15 ciclos de 30 μL de amostra foram transportados para o capilar PPY de 60 cm de comprimento. Adicional aumento no número de ciclos, no volume de amostra e no comprimento do capilar resultou em maior tempo de análise, sem aumento significativo na sensibilidade analítica, e picos com cauda ⁵⁸.

Dessorção dos compostos do capilar

A dessorção dos analitos do capilar tem sido rápida, pois a coluna capilar apresenta fase estacionária com espessura ao redor de 0,1 μm . Este processo tem sido realizado de dois modos: dinâmico (dessorção através da fase móvel) e estático (quando solvente orgânico é aspirado e transportado para o capilar). A dessorção estática tem sido aplicada para compostos

fortemente adsorvidos à fase do capilar, neste caso a dessorção deverá ser rápida e eficiente, com reduzido volume de solvente. Para um capilar (60 cm x 0,25 mm d.i.) a dessorção tem sido realizada aspirando 40 µL de solvente. Deve-se considerar a capacidade da coluna e solubilidade do solvente com a fase móvel. Já para o modo dinâmico é possível a dessorção direta com o fluxo da fase móvel, apenas girando a válvula do LC para a posição injetar.

1.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

A cromatografia líquida de alta eficiência (LC) é uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, a fase móvel, líquida, e a fase estacionária, contida em uma coluna. As separações são baseadas nos processos de partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada. Vários fatores químicos e físico-químicos influenciam na separação cromatográfica, esses dependem da natureza química das substâncias a serem separadas, da composição e fluxo da fase móvel, da composição e área superficial da fase estacionária.

O equipamento utilizado consiste em um reservatório que contém a fase móvel, uma bomba com a finalidade de transportar a fase móvel pelo sistema cromatográfico, um injetor para introduzir a amostra no sistema, uma coluna cromatográfica, um detector e um dispositivo de captura de dados, como um computador, integrador ou registrador (Figura 10). Além de receber e enviar informações para o detector, o computador é utilizado para controlar todo o sistema cromatográfico, proporcionando maior operacionalidade e logística de análise.

Figura10. Esquema do sistema cromatográfico LC ⁶⁰.

A LC tem sido, atualmente, a técnica analítica mais usada na indústria farmacêutica, com destaque para a LC em fase reversa, a qual tem demonstrado ser muito versátil em sua capacidade para análise simultânea de compostos de baixa massa molecular e de diferentes polaridades, além da possibilidade do uso de fases móveis aquosas.

As fases estacionárias utilizadas em fase reversa consistem, tipicamente, de uma molécula orgânica quimicamente ligada à sílica ou outros suportes, como grafita porosa. O diâmetro das partículas tem sido de, normalmente, 3 a 10 μm . Quanto menor o diâmetro da partícula e da película que recobre o suporte, mais rápida e eficiente será a transferência das substâncias entre as fases estacionária e móvel.

O princípio da cromatografia em fase reversa, onde a fase móvel é mais polar que a fase estacionária, é a hidrofobia. A separação em fase reversa deve-se principalmente a interações entre a parte não-polar do soluto e a fase estacionária, isto é, à repulsão desta parte do soluto pela fase móvel aquosa. A fase móvel mais comumente utilizada em fase reversa é a mistura água/acetonitrila, sendo que a acetonitrila, quando necessário, substituída por metanol

ou tetraidrofurano (THF). É importante ressaltar que a força do solvente em fase reversa aumenta com o decréscimo da polaridade do solvente ⁶¹.

Em cromatografia em fase reversa, a retenção diminui para compostos mais hidrofílicos, assim, quando um ácido ou uma base são ionizados, estes tornam-se menos hidrofóbicos e, conseqüentemente, a retenção é reduzida. Assim, com o aumento de pH, a retenção para ácidos diminui e para bases aumenta ⁶¹.

Quando o pH é igual ao pKa de um composto, este encontra-se parcialmente ionizado. Todas as mudanças de retenção ocorrem dentro de uma faixa de $\pm 1,5$ unidade de pKa. Fora desta faixa, o composto ou está ionizado ou está não-ionizado, e a retenção não muda muito. A situação é mais complicada para compostos que contêm múltiplos grupos ácidos ou básicos. Para compostos anfóteros, a retenção pode ser ainda mais complexa. A molécula é mais hidrofílica quando a carga total de íons é zero, ou seja, maximamente ionizada ⁶¹.

1.6. DETECTORES

Os detectores mais frequentemente utilizados em LC são os espectrofotométricos. Tais detectores consistem de uma célula de fluxo localizada no término da coluna cromatográfica. A radiação ultravioleta passa, continuamente, pela célula de fluxo e é recebida pelo detector. Com o sistema em funcionamento, as substâncias são eluídas da coluna, passam pela célula de fluxo e absorvem radiação, resultando em alterações mensuráveis no nível de energia. Esses detectores podem apresentar comprimento de onda fixo, variável ou múltiplo. Detectores de comprimento de onda fixo operam em um único valor, geralmente em 254 nm, emitido por uma lâmpada de mercúrio de baixa pressão. Aqueles com comprimento de onda variável, contém uma fonte contínua de emissão, como uma lâmpada de deutério ou xenônio de alta pressão, e um monocromador ou um filtro de interferência, de modo a gerar radiação monocromática a um valor selecionado pelo operador, podendo, ainda, ser programados para

alterar o comprimento de onda durante o desenvolvimento da análise. A Figura 11 ilustra um detector de UV, de comprimento de onda variável.

Figura 11. Esquema de um detector UV (comprimento de onda variável) ⁶².

Os detectores de comprimento de onda múltiplo medem, simultaneamente, a absorbância em dois ou mais comprimentos de onda, sendo denominados de detectores de arranjo de diodos (DAD), Figura 12. Nestes, a radiação ultravioleta é transmitida através da célula de fluxo, absorvida pela amostra e então separada em seus componentes originais, que são detectados, individualmente, pelo detector de fotodiodos, registrando dados de absorbância em toda a faixa do espectro de ultravioleta e visível e, adicionalmente, os espectros de cada pico registrado no cromatograma.

Figura 12. Esquema de um detector de arranjo de diodo (DAD) ⁶².

1.7. VALIDAÇÃO ANALÍTICA ^{61, 63}

A validação analítica dos métodos cromatográficos tem sido realizada para a minimização de erros, assegurar a máxima qualidade do trabalho analítico e, conseqüentemente, a obtenção de resultados laboratoriais confiáveis.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), preconiza a avaliação dos seguintes parâmetros de validação analítica: recuperação, exatidão, precisão, linearidade, especificidade, limite de quantificação (LQ), detecção (LD), bem como estabelece os limites de tolerância, garantindo assim, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. A ANVISA também determina que a validação de todos os métodos bioanalíticos, envolvendo métodos cromatográficos de análise, seja realizada empregando-se o método do padrão interno.

A validação dos métodos analíticos para análises de fármacos em fluidos biológicos deverá ser realizada utilizando-se amostras biológicas de referência, enriquecidas com os analitos em diferentes concentrações (considerando o intervalo terapêutico), avaliando os parâmetros descritos a seguir:

Linearidade

A linearidade corresponde ao intervalo de concentração plasmática, onde os resultados obtidos, segundo o método padronizado, são diretamente proporcionais às concentrações dos analitos em análise no fluido biológico. Deverá ser determinada através da análise de amostras plasma de referência enriquecidas, no mínimo, com 5 (cinco) concentrações diferentes. As curvas obtidas deverão ser apresentadas, assim como o coeficiente de correlação linear e o intercepto da reta, obtidos pelo cálculo de regressão linear.

Curva de Calibração

Deverá ser construída para cada analito, utilizando-se a matriz biológica (plasma branco de referência). Incluir a análise de cinco a oito amostras enriquecidas com o analito em diferentes concentrações, contemplando o limite de variação esperado (80% da concentração mais baixa e 120% da concentração mais alta que se pretende analisar), inclusive o LQ (limite de quantificação).

A curva de calibração deverá apresentar CV (coeficiente de variação) menor ou igual a 20% (vinte por cento) em relação à concentração nominal para o LQ e CV menor ou igual a 15% (quinze por cento) em relação à concentração nominal para as demais concentrações. No mínimo, quatro de seis concentrações da curva de calibração deverão cumprir com os critérios anteriores, incluindo o LQ e a maior concentração da curva de calibração. O coeficiente de correlação linear deverá ser igual ou superior a 0,95.

Limite de quantificação (LQ)

É a menor quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão ⁶³. As concentrações dos analitos no LQ deverão ser identificáveis e reprodutíveis com precisão de 20% e exatidão de 80-120%. O LQ deverá ser no mínimo cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branco no tempo de retenção dos fármacos.

Limite de detecção (LD)

É a menor concentração de um analito que o procedimento consegue diferenciar confiavelmente do ruído de fundo ⁶³. Será estabelecido através da análise de soluções-padrão de concentrações conhecidas e decrescentes dos fármacos, até o menor nível detectável. Recomenda-se que o LD seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base.

Especificidade

Trata-se da habilidade do método de medir e diferenciar o analito de componentes que possam estar presentes na amostra, tais como metabólitos, impurezas, compostos de degradação ou componentes da matriz ⁶³. As amostras da matriz biológica (plasma de referência, livres dos analitos) deverão ser testadas utilizando o procedimento de extração e as condições cromatográficas propostas. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos com solução-padrão dos fármacos, em concentração próxima ao LQ. Qualquer amostra de matriz biológica de referência (branco) que apresentar interferência significativa no tempo de retenção dos analitos, metabólito dos mesmos ou padrão interno, deverá ser rejeitada. Caso uma ou mais das amostras analisadas apresentarem tal interferência, novas amostras de matriz biológica de referência deverão ser testadas. Caso uma ou mais destas amostras apresentarem interferência significativa no tempo de retenção dos fármacos, o método em ensaio deverá ser alterado visando eliminá-la. A resposta de picos interferentes no tempo de retenção dos fármacos deverá ser inferior a 20% da resposta do LQ.

Precisão

Representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio ⁶³. A repetibilidade do método deverá ser determinada em um mesmo dia (precisão intra-ensaio) e em dias diferentes (precisão inter ensaio). A precisão deverá ser expressa pelo coeficiente de variação (CV), não se admitindo valores superiores a 15%.

Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência ⁶³. Deverá ser expressa através da razão entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente em três concentrações (baixa, média e alta) dentro da faixa de limite esperado, realizando-se pelo

menos cinco réplicas. O desvio não deverá exceder 15% (quinze por cento), exceto para o LQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20% (vinte por cento).

Recuperação

Avalia a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação aceitável. Recuperações próximas a 100% são as desejáveis, porém tem-se admitido valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata. Este teste deverá ser realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas, a partir de três concentrações (baixa, média e alta) com os resultados obtidos com soluções padrão não extraídas, que representam 100% de recuperação.

2. OBJETIVOS

- Padronização do método SPME/LC para análise simultânea de antidepressivos não-tricíclicos (mirtazapina, citalopram, paroxetina, fluoxetina e sertralina) em amostra de plasma para fins de monitorização terapêutica.

- Otimização das condições cromatográficas.
- Otimização das variáveis SPME.
- Avaliação da influência das proteínas no processo SPME.

- Validação analítica do método SPME/LC.
- Análise de amostras de pacientes em terapia com os antidepressivos.

- Padronização do método “in tube” SPME/LC para análise dos antidepressivos não-tricíclicos (mirtazapina, citalopram, paroxetina, duloxetine, fluoxetina e sertralina) em amostra de plasma para fins de monitorização terapêutica.

- Otimização das condições cromatográficas.
- Acoplamento do capilar no sistema LC.
- Desenvolvimento do programa no injetor automático para as análises “in tube” SPME/LC.
- Otimização das variáveis “in tube” SPME.

- Validação analítica do método “in tube” SPME/LC.
- Análise de amostras de pacientes em terapia com os antidepressivos.

- Comparação dos métodos SPME/LC e “in tube” SPME/LC para análise de antidepressivos em amostra de plasma para fins de monitorização terapêutica.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. PADRÕES ANALÍTICOS E REAGENTES

Os padrões primários dos antidepressivos fluoxetina e duloxetina foram gentilmente doados pelos laboratórios *Lilly* (São Paulo, Brasil) e a paroxetina pela *Libbs* (São Paulo, Brasil). Citalopram (CIT), mirtazapina (MIR) e sertralina (SER) pela *Ciba-Geigy* (São Paulo, Brasil) e clomipramina (CLO) (padrão interno) pela *Pfizer* (São Paulo, Brasil). As soluções padrão diluídas dos antidepressivos foram preparadas considerando o intervalo terapêutico, a partir da diluição de suas respectivas soluções estoques de 1mg mL^{-1} em metanol. Estas soluções apresentaram estabilidade de 45 dias, quando permanecidas a -20°C .

O cloreto de sódio, NaCl (Mallinckrodt Baker – Xalostoc, México) foi utilizado após purificação por aquecimento a 300°C por 15 horas. O metanol e a acetonitrila, grau HPLC foram adquiridos do fornecedor J.T. Backer (Phillipsburg, USA), ácido clorídrico, fosfato de potássico monobásico e dibásico, borato de sódio, acetato de sódio e ácido acético da Mallinckrodt Baker (Xalostoc, México). A água utilizada nos ensaios foi purificada pelo sistema Milli-Q, Millipore (São Paulo, Brasil).

3.2. AMOSTRAS DE PLASMA

As amostras de plasma, branco de referência, livres de antidepressivos, sorologia negativa para hepatite B e C, chagas, HIV, HTLV-I/II, TGP e sífilis foram cedidas pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto-USP. Estas amostras foram enriquecidas com soluções-padrão dos analitos ($50\text{ }\mu\text{L}$) em diferentes concentrações e com o padrão interno (clomipramina, na concentração de 500 ng mL^{-1}), as quais resultaram em

concentrações plasmáticas que incluem os níveis terapêuticos. Estas amostras de plasma foram utilizadas na validação analítica do método SPME/LC e “in tube” SPME/LC.

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

A declaração do comitê de ética da Universidade de São Paulo aprovando o uso de plasma neste estudo encontra-se no Anexo 1.

3.3. INSTRUMENTAÇÃO SPME

O dispositivo SPME e as fibras polidimetilsiloxano (PDMS, 100 μm), carbowax/TPR-100 (CW/TPR, 50 μm), polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB, 65 μm) e carbowax-divinilbenzeno (CW/DVB, 65 μm) foram adquiridos do fornecedor Supelco[®] (São Paulo, Brasil). As fibras foram condicionadas por 30 min em metanol, antes de serem utilizadas nas extrações.

O capilar utilizado no método “in tube” SPME/LC (OV-1701, 80 cm, 250 μm d.i. e 0,1 μm de diâmetro do filme) foi desenvolvida no Laboratório de Cromatografia do Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, sendo condicionado, antes do processo de extração, com a própria fase móvel: tampão fosfato (0,05 mol L⁻¹ pH = 3.8) e acetonitrila (53:47, v:v) durante 30 minutos com fluxo de 1,0 mL/min.

O capilar de sílica fundida OV-1701 foi acoplada junto ao injetor automático do LC, substituindo a alça de amostragem do injetor.

O agitador magnético (Fisatom[®] – Modelo 752A) e banho termoestabilizado foram utilizados nas extrações SPME “off line”, para a obtenção de eficiente processo de agitação em temperatura isotérmica.

3.4. SPME/LC

3.4.1. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Para a obtenção de satisfatória resolução cromatográfica dos fármacos, em menor tempo de análise, diferentes composições de fases móveis foram avaliadas (Tabela 4).

Tabela 4: Composição das fases móveis avaliadas.

Fases	Tampão Acetato 0,25mol L ⁻¹ pH 4,5	Acetonitrila	Metanol	Isopropanol
1	60%	38%	1,9%	0,1%
2	60%	40%	—	—
3	60%	36,5%	3,3%	0,2%
4	60%	38%	2%	—
5	50%	45%	4%	1%
6	60%	37%	3%	—
7	55%	41%	4%	—
8	50%	50%	—	—
9	60%	37%	3%	—

Após a otimização da composição da fase móvel, as análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido da *Varian*, modelo 230, equipado com injetor “*Rheodyne*”, “loop” de 50 µL, detector Ultravioleta (*Varian*, modelo 310) e detector de arranjo de diodos (*Varian*, modelo 330), comprimento de onda selecionado em $\lambda = 230$ nm. Os fármacos foram separados em coluna Lichrospher® 60 RP-Select B (5 µm, 250 x 4 mm) (Merk – Darmstadt, Alemanha), com pré-coluna RP-Select B (Merk – Darmstadt, Alemanha), LiChroCART® 4-4. A fase móvel selecionada foi entre as avaliadas, a solução tampão acetato 0,25 mol L⁻¹,

pH 4,5, acetonitrila e metanol (60:37:3 v/v/v) com fluxo de 1 mL min^{-1} (fase móvel nº 9 – Tabela 4), no modo isocrático. Antes do uso, a fase móvel foi filtrada e degaseificada.

3.4.2 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO SPME

A otimização do processo SPME com dessorção “off line” foi realizada em solução aquosa com o objetivo de preservar as fibras SPME, pois as proteínas do plasma podem adsorver de forma irreversível à fase extratora, diminuindo o tempo de utilização das fibras.

As variáveis do processo SPME foram otimizadas para a obtenção de eficiente extração em menor tempo de análise. O primeiro passo foi selecionar a fase extratora. As fibras SPME: PDMS, CW/TPR, PDMS/DVB e CW/DVB foram avaliadas.

Para isso, o seguinte procedimento foi realizado: em um frasco cônico de vidro (5 mL) com tampa rosca e septo de silicone, 1 mL de água enriquecida com solução padrão dos antidepressivos, resultando na concentração de 500 ng mL^{-1} , foi diluído com 4 mL de solução tampão borato (pH 9,0; $0,05 \text{ mol L}^{-1}$). A fibra foi inserida na amostra (modo direto) e a extração realizada a 45°C , durante 45 minutos. A agitação magnética foi constante e em velocidade máxima para todas as extrações.

A dessorção dos fármacos foi realizada pela exposição da fibra em acetonitrila. O extrato obtido foi seco e reconstituído com $200 \mu\text{L}$ de fase móvel. Após agitação em “mixer”, $50 \mu\text{L}$ foram injetados no cromatógrafo.

A fibra que apresentou o melhor resultado foi utilizada para a otimização das demais variáveis SPME: pH da matriz, força iônica (adição de sal), tempo e temperatura de extração e de dessorção.

Para avaliar a influência do pH no processo de extração, quatro diferentes soluções tampão foram utilizadas, com os seguintes valores de pH: 4,5 (tampão acetato, $0,25 \text{ mol L}^{-1}$); 6,9 (tampão fosfato, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$); 9,0 e 10,0 (tampão borato, $0,05 \text{ mol L}^{-1}$).

A influência da força iônica no processo SPME foi avaliada adicionando 10% de NaCl puro à matriz aquosa. Os tempos de extração (15, 30, 45 e 60 minutos) foram avaliados em conjunto com as variações de temperatura (15, 30, 45 e 60°C). Já o processo de dessorção foi avaliado a temperatura de 60°C em diferentes tempos de dessorção (5, 15, 30, 45 e 60 minutos), sendo que inicialmente foi otimizado o processo de extração.

Entre as extrações, a fibra foi submetida a um processo de lavagem, de acordo com o seguinte procedimento: adicionou-se a um frasco de extração (já contendo uma barra magnética triangular) uma solução de água Milli-Q e metanol (50:50 v/v) e vedou-se com um septo de silicone. Perfurou-se o septo e expôs-se a fibra por 30 minutos sob agitação.

3.4.3. VALIDAÇÃO ANALÍTICA

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

Os parâmetros de validação analítica foram avaliados segundo normas da ANVISA, descritas no item 1.6.

3.5. “IN TUBE” SPME/LC

3.5.1. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Para a obtenção de satisfatória resolução cromatográfica dos fármacos, em menor tempo de análise, a fase móvel solução tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 3,8 e acetonitrila (53: 47 v/v) foi avaliada e comparada com a selecionada para o método SPME/LC.

Após a otimização da composição da fase móvel, as análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido (*Varian*, modelo 230) acoplado a um injetor automático,

(*Varian*, modelo 430) e detectores ultravioleta (*Varian*, modelo 310) e detector de arranjo de diodos (*Varian* , modelo 330). O comprimento de onda foi selecionado em $\lambda = 230$ nm. Os fármacos foram separados em coluna Lichrospher[®]60 RP-Select B (5 μ m, 250 x 4 mm) (Merk), com pré-coluna RP-Select B (Merk), LiChroCART[®]4-4. A fase móvel usada foi solução tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 3,8 e acetonitrila (57:43 v/v) com fluxo de 1 mL min⁻¹, no modo isocrático. Antes do uso, a fase móvel foi filtrada e desgaseificada.

3.5.2. DESENVOLVIMENTO DO PROGRAMA DO INJETOR AUTOMÁTICO (LC) PARA AS ANÁLISES “IN TUBE” SPME.

As extrações “in tube” SPME foram realizadas segundo o programa descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Programa utilizado nas extrações “in tube” SPME.

AÇÃO	POSIÇÃO	QUANTIDADE	FLUXO/ AJUSTE	ALTURA DA AGULHA* / PASSOS
LAVAR AGULHA	-----	250 µL (água metanol, 50:50 v/v)	-----	-----
VÁLVULA INJETOR	CARREGAR	-----	-----	-----
ASPIRAR DE	FRASCO A	200 µL de água	3 (ALTO)	5 mm
DISPENSAR EM	FRASCO B	200 µL de água	3 (ALTO)	5 mm
REPETIR	-----	2 VEZES	3 (ALTO)	2 ANTERIORES
ASPIRAR DE	AMOSTRA	100 µL	2 (MÉDIO)	5 mm
AGUARDAR	-----	2 MINUTOS	-----	-----
DISPENSAR EM	AMOSTRA	100 µL	2 (MÉDIO)	5 mm
REPETIR	-----	9 VEZES	-----	3 ANTERIORES
ASPIRAR DE	AMOSTRA	100 µL	2 (MÉDIO)	5 mm
AGUARDAR	-----	2 MINUTOS	-----	-----
DISPENSAR EM	AMOSTRA	100 µL	2 (MÉDIO)	5 mm
REPETIR	-----	9 VEZES	-----	3 ANTERIORES
VÁLVULA INJETOR	INJETAR	-----	-----	-----
AJUSTAR A SAÍDA	INJETAR	-----	-----	-----

* Altura correspondente à base do frasco até a ponta da agulha.

Velocidades: 2 (315 µL min⁻¹) e 3 (625 µL min⁻¹).

3.5.3. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO “in tube” SPME

O processo de otimização das variáveis “in tube” SPME, assim como em SPME, foi realizado em solução aquosa, a fim de se preservar o capilar da adsorção irreversível das proteínas do plasma, que neste caso, poderá também ocasionar o entupimento do capilar, dificultando a passagem contínua e livre da amostra, bem como da fase móvel.

Os seguintes parâmetros foram otimizados no processo “in tube” SPME: número e fluxo dos ciclos aspirar/dispensar, pH da matriz e volume de amostra aspirada.

Para a otimização, o seguinte procedimento foi realizado: em um frasco (2 mL) com tampa de rosca e septo de silicone, específico para o injetor automático, 0,5 mL de água enriquecida com solução padrão dos antidepressivos, resultando na concentração de 500 ng mL^{-1} , foram diluídos com 0,5 mL de solução tampão borato (pH 9,0 ; $0,05 \text{ mol L}^{-1}$). O frasco contendo a amostra foi colocado na bandeja do injetor automático para a realização do processo de extração.

Para avaliar a influência do pH no processo de extração, quatro diferentes soluções tampão foram utilizadas, com os seguintes valores de pH: 4,5 (tampão acetato, $0,25 \text{ mol L}^{-1}$); 6,9 (tampão fosfato, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$); 9,0 e 10,0 (tampão borato, $0,05 \text{ mol L}^{-1}$).

Com base no volume do capilar ($\sim 40 \text{ }\mu\text{L}$) e da seringa do injetor automático ($250 \text{ }\mu\text{L}$), os seguintes volumes de amostra foram avaliados: 40, 60, 80, 100, 150, 200 e $250 \text{ }\mu\text{L}$.

Após a otimização do volume de amostra, a influência do número e do fluxo dos ciclos aspirar/dispensar foram avaliados. Três diferentes fluxos, baixo ($125 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$), médio ($315 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$) e alto ($625 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$), foram testados. Para os fluxos maiores que $625 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ foi observado a formação de bolhas em toda tubulação do injetor, o que dificultou a repetitividade dos volumes aspirados, além da possibilidade de causar danos à coluna analítica. Os números de ciclos aspirar/dispensar avaliados foram: 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 ciclos.

Após otimizar o pH da matriz, volume de amostra aspirada e número e fluxo dos ciclos aspirar/dispensar, foi testado o comando “aguardar”, presente no programa do injetor automático, que propicia maior tempo de contato da amostra aspirada com a fase extratora do capilar. Tal comando foi inserido entre os passos “aspirar” e “dispensar” e foi avaliado em três diferentes tempos: 30, 60 e 120 segundos.

Entre as extrações, a tubulação, a seringa e a agulha do injetor automático passaram pelo seguinte processo de lavagem: 250 μL de uma solução de metanol e água Milli-Q (50:50 v/v) percorreu o trajeto que, em algum momento do processo de extração, pôde ter entrado em contato com a amostra.

3.5.4. PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para a validação analítica do método “in tube” SPME, as proteínas das amostras de plasma (branco de referência) foram precipitadas com o intuito de impedir o entupimento do capilar ou mesmo da coluna analítica. Para isso, foram testadas duas metodologias diferentes para precipitação de proteínas: ácido acético 1% (v/v) e acetonitrila. O primeiro, foi realizado da seguinte maneira: em 1 mL de plasma foram adicionados 4 mL de ácido acético 1% (v/v). Após agitação em mixer, a mistura foi centrifugada por 20 minutos em velocidade de 3000 rpm e então, o sobrenadante foi tratado com solução de hidróxido de sódio 5 mol L^{-1} até atingir pH próximo da neutralidade (pH = 7,4). Já a precipitação utilizando-se acetonitrila foi realizada através da adição de acetonitrila à amostra de plasma, na proporção de 2:1 (v/v), respectivamente. Após agitação, o tubo de ensaio contendo a mistura foi levado à centrífuga por 20 minutos em velocidade de 3000 rpm. Completada a precipitação, o sobrenadante foi recolhido e seco, eliminando-se a acetonitrila da amostra.

3.5.5. VALIDAÇÃO ANALÍTICA

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

Os parâmetros de validação analítica foram avaliados segundo normas da ANVISA, descritas no item 1.6.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA LC/UV

A identificação dos fármacos em amostras de plasma foi realizada pela comparação dos tempos de retenção obtidos nas análises, com os das soluções-padrão dos analitos, injetadas individualmente nas mesmas condições cromatográficas. Os espectros (absorbância *versus* comprimento de onda) na região do ultravioleta (UV) também foram considerados (Anexo 2).

Para a quantificação, utilizou-se o método do padrão interno (P.I.). A clomipramina (Figura 13) foi selecionada como padrão interno, pois ultimamente, este antidepressivo tem sido pouco utilizado no tratamento da depressão. Este apresentou boa resolução cromatográfica e pôde ser adicionado em concentrações similares a dos analitos. É importante salientar que na otimização das variáveis SPME, a clomipramina apresentou coeficiente de partição semelhante aos demais fármacos. O método do P.I. é extremamente vantajoso, pois minimiza erros que poderiam ser gerados por variações da matriz biológica, nas variáveis experimentais ou mesmo na fase extratora.

Figura 13. Estrutura química da clomipramina (padrão interno).

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

4.2. MÉTODO SPME/LC COM DESSORÇÃO “OFF LINE”

4.2.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES SPME

A otimização das variáveis SPME: fase extratora, pH e força iônica da matriz, tempo e temperatura de extração e de dessorção dos analitos, torna-se necessária para a obtenção de eficiente processo de extração.

As propriedades (físicas e químicas) do revestimento (fase extratora) das fibras influenciam significativamente o processo de partição. Dois diferentes tipos de fase extratora (SPME) foram avaliados: PDMS (polímero puro homogêneo que extrai analitos através da absorção), e revestimentos mistos, PDMS/DVB, CW/DVB e CW/TPR, onde as fases extradoras são sólidos porosos, os quais extraem analitos através do processo de adsorção³⁹.

Segundo a regra “similar atrai similar”, a polaridade do revestimento deverá ser similar à polaridade do analito, desta forma, espera-se que o coeficiente de partição seja elevado para

um revestimento não-polar e um analito não-polar. O número de grupos NRH, NH₂ e OH, os quais propiciam as ligações de hidrogênio, é uma propriedade importante dos analitos. Estes grupos determinam principalmente a hidrofiliicidade de um analito e, conseqüentemente, a afinidade ao revestimento. Além disso, o revestimento deve ser resistente às condições do meio de extração, tais como: pH, adição de sais, aditivos orgânicos e temperaturas elevadas ⁴⁰.

Considerando os fundamentos teóricos descritos e na eficiência das extrações (Figura 14), a fibra de PDMS/DVB, entre as investigadas (PDMS, PDMS-DVB, CW/TPR-100, CW/DVB), foi selecionada para otimizar as demais variáveis SPME.

Figura 14. Seleção da fibra extratora para análise SPME/LC. Condições SPME: amostra aquosa (1 mL) enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹, diluída com 4 mL de solução tampão borato (0,05 mol/L, pH 9,0), T = 60°C, t = 45min. Dessorção em acetonitrila durante 45 min a 60°C.

A agitação magnética, por sua simplicidade, foi a técnica utilizada. Outras técnicas demandam dispositivos mais complexos: vibração da fibra, usada em injetor automático (GC), movimentação circular do frasco e sonicação.

A adição de sal à matriz influenciou na eficiência do processo SPME de maneira negativa, ou seja, diminuiu a taxa de extração dos fármacos. Esta característica pode ser explicada da seguinte maneira: apesar de existir o efeito “salting-out”, que diminui a solubilidade desses fármacos na matriz, o fato de os antidepressivos serem polares faz com que ocorram interações eletrostáticas entre o sal adicionado e os analitos, provocando a diminuição da sua difusão à fase extratora. O efeito da adição de NaCl (aumento da força iônica da matriz) foi avaliado na concentração de 10,0% em pH 9,0.

Em decorrência da viscosidade das matrizes biológicas, como o plasma, a transferência de massa do analito para a fase extratora, processo de difusão, é comprometida. As proteínas, compostos de alta massa molecular, podem adsorver de forma irreversível às fibras, diminuindo a capacidade extratora do revestimento da fibra SPME, assim como seu tempo de uso.

Para solucionar este problema, o plasma foi diluído com solução tampão, o que resultou em aumento da eficiência do processo SPME. A diluição diminuiu a viscosidade do plasma, aumentando o coeficiente de difusão dos fármacos presentes na fase biológica para a polimérica ⁶⁴. Diferentes soluções tampão foram avaliadas: pH 4,5 (tampão acetato, 0,25 mol L⁻¹); pH 6,9 (tampão fosfato, 0,01 mol L⁻¹); pH 9,0 e pH 10,0 (tampão borato, 0,05 mol L⁻¹).

O efeito de diferentes valores de pH da amostra na eficiência do processo SPME é ilustrado na Figura 15.

Figura 15. Otimização do pH da matriz para as análises SPME/LC. Condições SPME: amostra aquosa (1 mL) enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹, diluída com 4 mL de solução tampão borato (0,05 mol/L, pH 9,0), T = 60°C, t = 45min. Dessorção em acetonitrila durante 45 min a 60°C.

Segundo a literatura^{15, 16, 18, 19}, o ajuste do pH da solução da amostra poderá alterar os valores da constante de ionização (K) para espécies dissociáveis, assumindo que somente as formas ácidas e básicas, não dissociadas, podem ser extraídas pela fibra SPME. As extrações realizadas em pH 9,0 obtiveram os melhores resultados, para a maioria dos analitos. Desta forma, para as análises seguintes foi utilizado este valor de pH. Este resultado já era esperado pois, segundo os valores de pK_b dos antidepressivos estudados (Tabela 6), neste pH estes fármacos encontram parcialmente dissociados ou não dissociados.

Tabela 6. Valores de pKa dos antidepressivos analisados ⁶⁵.

Antidepressivos	pKa
Mirtazapina	7,1
Citalopram	9,5
Paroxetina	9,9
Duloxetina	9,3
Fluoxetina	8,7
Sertralina	9,5

O tempo de extração (equilíbrio de partição) tem sido definido como o intervalo no qual a quantidade do analito extraído permanece constante após tempo infinito, considerando o limite do erro experimental ^{15, 16, 18, 19}.

O aumento da temperatura de extração apresenta dois efeitos importantes: a) diminui o coeficiente de partição do fármaco (amostra/fase da fibra), resultando em menor quantidade de analito extraído; b) aumenta a difusão do analito e conseqüentemente diminui o tempo de equilíbrio de extração. Vários autores têm relatado que o aumento da temperatura de extração resulta em maior quantidade de fármaco extraído. Isto ocorre pois, a baixas temperaturas, o processo de extração está mais distante do equilíbrio de partição; já em altas temperaturas, com o mesmo tempo de extração, o equilíbrio de partição entre as fases poderá ocorrer mais rapidamente ¹⁹.

As variáveis tempo de extração e temperatura de extração foram otimizadas simultaneamente. Na Figura 16, pode-se notar que as variáveis tempo e temperatura de extração não atingiram as condições de equilíbrio, ou seja, o aumento gradual dessas variáveis foi acompanhado pelo aumento da eficiência das extrações.

Como o processo SPME torna-se inviável com tempo de extração muito prolongado e à alta temperatura, optou-se por realizar as extrações fora do equilíbrio de partição, nas seguintes condições: tempo de extração de 45 minutos e temperatura de 60°C. Segundo a literatura, quando o tempo de equilíbrio for excessivamente longo, menor tempo de extração poderá ser utilizado. No entanto, as variáveis do processo SPME deverão ser rigorosamente controladas para assegurar precisão analítica. No equilíbrio, pequenas variações no tempo de extração não afetam a quantidade de analito extraído pela fibra ^{15, 16, 18, 19}.

Figura 16. Otimização simultânea do tempo e temperatura de extração para análises SPME/LC. Condições SPME: amostra aquosa (1 mL) enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL^{-1} , diluída com 4 mL de solução tampão borato (0,05 mol/L, pH 9,0), $T = 60^\circ\text{C}$, $t = 45\text{min}$. Dessorção em acetonitrila durante 45 min a 60°C .

O processo de dessorção, realizado a 60 °C (temperatura selecionada para o processo de extração) durante 15 minutos foi o mais satisfatório, considerando o menor tempo e quantidade de analito dessorvido. Após este período, uma diminuição da eficiência do processo SPME foi observada.

Com relação à robustez da fibra de PDMS/DVB, esta poderá ser utilizada 50 vezes, com perda mínima da eficiência da extração.

Baseando-se nos resultados experimentais obtidos, as melhores condições, entre as investigadas para o processo de SPME, foram as seguintes: extração direta com a fibra PDMS/DVB (espessura do filme - 65 µm), 1,0 mL de amostra diluída com 4 mL de solução tampão borato (pH 9,0), temperatura de extração a 60°C, tempo de extração de 45 min, sob máxima agitação, permitida pelo agitador magnético. O processo de dessorção dos fármacos foi realizado pela exposição da fibra em acetonitrila à 60°C, durante 15 minutos.

4.2.2. VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO SPME/LC

Para a validação analítica do método SPME/LC padronizado, os seguintes parâmetros foram avaliados: especificidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão, linearidade e recuperação.

A especificidade (seletividade) do método SPME/LC é demonstrada pelos seguintes cromatogramas: plasma branco de referência (Figura 17) e amostra de plasma de referência enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹ (Figura 18). Nestes cromatogramas não foram observadas interferências significativas (componentes endógenos) nos tempos de retenção dos analitos.

Figura 17. Cromatograma do plasma branco de referência obtido por SPME/LC.

Figura 18. Cromatograma da amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL^{-1} .

A precisão inter-ensaios do método padronizado (SPME/LC) foi determinada utilizando-se amostras de plasma (branco de referência) enriquecidas com os fármacos nas concentrações de 200, 300 e 500 ng mL⁻¹ (Tabela 7). Os coeficientes de variação nas três concentrações analisadas foram menores que 15%, para todos os fármacos estudados, mostrando que o método proposto pode ser utilizado na quantificação destes antidepressivos em concentrações referentes às encontradas em amostras de plasma de pacientes em terapia com os antidepressivos.

As recuperações absolutas foram avaliadas em replicatas (n = 5) a partir das amostras de plasma enriquecidas com padrões analíticos que resultaram na concentração de 500 ng mL⁻¹ (Tabela 7). A microextração em fase sólida para análise de fármacos presentes em matrizes complexas, tais como as amostras de plasma, apresentam baixas taxas de recuperação ⁶⁶⁻⁶⁷. A microextração em fase sólida não é um processo exaustivo: é baseado no equilíbrio de partição dos analitos entre uma microfase que recobre a fibra SPME e a matriz biológica. Porém, baixa recuperação não implica em sensibilidade analítica ou precisão não adequados à aplicação do método ⁶⁴.

Tabela 7. Precisão inter-ensaio e valores de recuperação absoluta para o método SPME/LC em amostras de plasma.

Antidepressivos	Concentração Adicionada (ng mL⁻¹)	$\bar{x} \pm DP$ (ng mL⁻¹)	CV (%) n = 5	Recuperação (%) n = 5 (500 ng mL⁻¹) ($\bar{x} \pm DP$)
Mirtazapina	50 (LQ)	53,3 ± 4,2	3,83	17,1 ± 2,1
	200	184,2 ± 16,6	8,30	
	300	279,5 ± 31,0	11,9	
	500	473,7 ± 19,3	7,30	
Citalopram	25 (LQ)	24,1 ± 2,9	5,02	8,1 ± 0,6
	200	193,5 ± 9,6	6,90	
	300	304,1 ± 11,2	3,30	
	500	496,4 ± 15,7	7,90	
Paroxetina	50 (LQ)	54,1 ± 5,5	2,66	11,9 ± 1,7
	200	187,9 ± 21,2	11,8	
	300	285,3 ± 20,8	8,30	
	500	478,5 ± 33,1	14,8	
Fluoxetina	25 (LQ)	27,2 ± 3,6	5,14	10,2 ± 1,0
	200	194,4 ± 7,0	4,90	
	300	290,0 ± 10,6	4,00	
	500	488,8 ± 17,3	8,50	
Sertralina	50 (LQ)	49,0 ± 2,4	4,69	8,1 ± 0,6
	200	190,8 ± 9,0	3,20	
	300	286,8 ± 16,5	6,00	
	500	479,9 ± 18,8	5,60	

*LQ: Coeficiente de variação na concentração correspondente ao limite de quantificação;
 $\bar{x}$: concentração média determinada; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

O limite de quantificação (LQ) dos antidepressivos investigados, em plasma, variou de 25 ng mL⁻¹ a 50 ng mL⁻¹ (Tabela 8). Este limite foi determinado como sendo a menor concentração da curva de calibração com coeficiente de variação (precisão) menor que 10%

(Tabela 8). Já o limite de detecção (LD), correspondente ao sinal analítico superior a três vezes o ruído da linha de base, variou de 10 ng mL⁻¹ a 25 ng mL⁻¹ (Tabela 8).

Tabela 8. Regressão linear, LQ e LD para o método SPME/LC.

Antidepressivos	Regressão linear (y = ax + b)			LD (ng mL ⁻¹)	LQ (ng mL ⁻¹)
	LQ* – 500 ng mL ⁻¹				
	a	b	r ²		
Mirtazapina	0,0029 ± 0,0001	0,0704 ± 0,0619	0,9996	25,0	50,0
Citalopram	0,0090 ± 0,0001	0,1004 ± 0,2203	0,9999	10,0	25,0
Paroxetina	0,0017 ± 0,0001	- 0,3864 ± 0,1871	0,9970	25,0	50,0
Fluoxetina	0,0033 ± 0,0001	- 0,1745 ± 0,0931	0,9998	10,0	25,0
Sertralina	0,0016 ± 0,0001	- 0,0671 ± 0,0338	0,9999	25,0	50,0

*LQ: Concentração que corresponde ao limite de quantificação.

As curvas de calibração, ou analíticas, para cada antidepressivo, contemplando 4 valores de concentrações (LQ, 200, 300 e 500 ng mL⁻¹) estão ilustradas na Figura 19.

Figura 19. Curvas de calibração dos antidepressivos no método SPME/LC.

A linearidade corresponde ao intervalo de concentração onde os resultados obtidos são diretamente proporcionais às concentrações dos analitos na amostra ⁶⁸. Segundo as normas da ANVISA, aceita-se valores de r^2 (coeficiente de regressão linear) maiores que 0,98. A linearidade do método SPME/LC foi determinada em amostra de plasma de referência enriquecida com os antidepressivos nas concentrações plasmáticas de 25 a 500 ng mL⁻¹ para o citalopram e fluoxetina, e de 50 a 500 ng mL⁻¹ para os demais antidepressivos.

Os intervalos avaliados foram lineares com coeficientes de regressão linear maiores que 0,997 e coeficientes de variação menores que 15% em todos os casos (Tabela 8). Estes resultados mostram que o método desenvolvido permite a quantificação dos antidepressivos em uma ampla faixa de concentração.

Embora os inibidores seletivos da recaptação de serotonina não apresentem intervalos terapêuticos bem definidos, a maioria dos estudos mostra que as concentrações plasmáticas variam entre 50 a 200 ng mL⁻¹ ⁵. O método SPME/LC apresentou intervalo de linearidade e valores de LQ próximo aos descritos na literatura para os métodos clássicos, LLE/LC e SPE/LC, os quais analisaram os mesmos antidepressivos em amostras biológicas ⁶⁹⁻⁷¹.

Para comprovar a exatidão do método SPME/LC, o método proposto foi comparado com o tradicional método de extração líquido-líquido ⁷² (LLE/LC). As amostras de plasma foram enriquecidas com as soluções padrão dos antidepressivos, resultando nas seguintes concentrações: 50 a 500 ng mL⁻¹ para mirtazapina, paroxetina e sertralina, de 25 a 500 ng mL⁻¹ para citalopram e fluoxetina. Estas amostras foram submetidas aos diferentes métodos de preparo de amostras, e os resultados foram comparados. A correlação entre os métodos mostrou linearidade satisfatória, com coeficiente de regressão linear acima de 0,99 para todos os antidepressivos (Tabela 9). Desta forma, as concentrações determinadas, segundo os diferentes métodos (SPME e LLE), são equivalentes, comprovando a exatidão do método SPME/LC.

Tabela 9. Comparação do método proposto SPME/LC com o método tradicional de extração líquido-líquido (LLE/LC).

Antidepressivos	Faixa linear	Regressão linear	Coefficiente de correlação (r^2)
Mirtazapina	50,0 – 500,0 ng/mL	$y = - 4,21 + 1,05 x$	0,9999
Citalopram	25,0 – 500,0 ng/mL	$y = - 4,92 + 0,99 x$	0,9988
Paroxetina	50,0 – 500,0 ng/mL	$y = - 9,45 + 1,05 x$	0,9999
Fluoxetina	25,0 – 500,0 ng/mL	$y = - 6,83 + 1,02 x$	0,9998
Sertralina	50,0 – 500,0 ng/mL	$y = - 9,78 + 0,04 x$	0,9987

Baseado nos resultados de validação analítica, a metodologia de SPME/LC padronizada permite a análise dos antidepressivos em níveis plasmáticos que contemplam o intervalo terapêutico.

4.2.3. ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PLASMA DE PACIENTES: APLICAÇÃO DO MÉTODO SPME/LC.

Os sintomas clínicos da depressão são detectáveis em aproximadamente 12 a 36% dos pacientes idosos que possuem outra enfermidade de ordem não-psíquica. Por causa das mudanças farmacocinéticas e farmacodinâmicas relacionadas ao envelhecimento, não é possível extrapolar automaticamente as doses administradas na população jovem para a população mais velha, a fim de se obter eficácia ou tolerabilidade semelhante. Em pacientes idosos, são frequentes os erros relacionados à administração de doses que acarretam efeitos adversos severos, assim como erros na escolha da medicação são frequentes. Na prática clínica, o esforço no que se refere à individualização do tratamento farmacológico com antidepressivos é frequentemente guiado por uma estratégia de experimentação e erro. Entretanto, com os antidepressivos usados na psiquiatria, a monitoração terapêutica é a

ferramenta adequada para encontrar a dosagem correta para cada indivíduo que faz uso destes fármacos, tentando sempre aumentar a eficácia, bem como a segurança do tratamento^{73,74}.

Para a avaliação da eficácia do método SPME/LC, padronizado e validado, para o uso clínico, este foi empregado para as análises das amostras de plasma de três pacientes idosos, as quais fazem uso dos antidepressivos citalopram (Celexa[®] - 50 mg/dia), paroxetina (Aropax[®] - 40 mg/dia) e sertralina (Zoloft[®] - 150 mg/dia), respectivamente.

O perfil dos picos cromatográficos e resolução dos antidepressivos foram similares aos obtidos nas análises de amostras de plasma branco enriquecidas com os analitos. Nenhuma interferência aparente foi observada nos tempos de retenção dos fármacos (Figura 20). As concentrações plasmáticas determinadas nas amostras dos pacientes foram as seguintes: 357 ng mL⁻¹ de citalopram (Figura 20a), 289 ng mL⁻¹ de paroxetina (Figura 20b) e 270 ng mL⁻¹ de sertralina (Figura 20c).

Figura 20. Análise SPME/LC de amostras de plasma de pacientes que administraram doses terapêuticas de antidepressivos não-tricíclicos. a) citalopram; b) paroxetina e c) sertralina.

4.3. MÉTODO “in tube” SPME/LC

4.3.1. OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS “in tube” SPME

A microextração realizada com fase extratora OV-1701 (14% cianopropilfenil metilpolisiloxano) baseia-se no processo de partição, ou seja, na distribuição do analito entre duas fases imiscíveis (o filme líquido da fase extratora e a amostra), que é determinado pela solubilidade do analito em cada fase. Não se trata de um processo competitivo, como ocorre nas fibras SPME mistas, geralmente empregadas para a análise de fármacos. A eficiência do processo “in tube” SPME depende principalmente da área superficial do filme líquido e da afinidade do analito pela fase extratora. Desta forma, o capilar de sílica fundida (80 cm de comprimento e 250 μm de diâmetro interno), área superficial de aproximadamente 6,3 cm^2 , revestido com a fase extratora OV-1701 foi selecionada para as análises de antidepressivos.

A otimização das variáveis “in tube” SPME: volume de amostra aspirada, pH da matriz, além do número e fluxo de ciclos aspirar/dispensar, foi realizada para obtenção de eficiente processo de extração.

O volume de amostra aspirada/dispensada está diretamente relacionado com a capacidade do capilar e da seringa do injetor automático, ou seja, volumes menores que a capacidade do capilar ($\sim 40 \mu\text{L}$) e maiores que o volume máximo da seringa (250 μL) são impraticáveis. Portanto, os volumes de amostra de 40 a 250 μL foram avaliados.

A eficiência do processo “in tube” SPME foi favorecida com o aumento do volume de amostra de 40 μL a 100 μL , quando o equilíbrio de partição foi alcançado, para a maioria dos fármacos. Após este valor, o aumento do volume de amostra, não interferiu na eficiência da extração (Figura 21).

Figura 21. Otimização do volume de amostra aspirado/dispensado para as análises “in tube” SPME. Condições “in tube” SPME: amostra aquosa (0,5 mL) enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹, diluída com 0,5 mL de solução tampão borato (0.05 mol/L, pH 9.0); 15 ciclos aspirar/dispensar com fluxo de 625 µL min⁻¹.

Como a fase extratora OV-1701 não é trocadora de íons, extrai somente espécies quimicamente neutras presentes na amostra, faz-se necessário o uso de soluções tampão para assegurar adequado pH da matriz. Segundo a Figura 22, a solução tampão borato 0,05 mol L⁻¹ pH = 9,0 (valor de pH próximo aos valores de pKa dos antidepressivos – Tabela 6) apresentou os resultados mais satisfatórios para a maioria dos antidepressivos.

A diluição da amostra com solução tampão resultou na diminuição da viscosidade da matriz biológica, favorecendo a difusão dos analitos na fase extratora.

Outra modificação na amostra passível de ser realizada é a adição de sal, modificando a força iônica, assim como foi realizado nas análises SPME, que influenciaria de alguma forma, positivamente pelo efeito “salting out” ou negativamente pelo efeito de atração eletrostática, no processo de extração. Porém, com o intuito de preservar o capilar de um possível entupimento, a adição de sal não foi avaliada.

Figura 22. Otimização do pH da matriz para as análises “in tube” SPME. Condições “in tube” SPME: amostra aquosa (0,5 mL) enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹, diluída com 0,5 mL de solução tampão; 100µL de amostra foi aspirada/dispensada durante 15 ciclos com fluxo de 625 µL min⁻¹.

No processo “in tube” SPME, a amostra é aspirada e dispensada do capilar várias vezes, até que se alcance o equilíbrio de partição. No entanto, o aumento do número de ciclos aspirar/dispensar poderá resultar em dessorção parcial do analito³⁹, durante a etapa dispensar, ou em picos com caudas.

Segundo os resultados obtidos na otimização do número de ciclos aspirar/dispensar (Figura 23), o equilíbrio de partição foi alcançado após 15 ciclos, ou seja, o aumento do número de ciclos aspirar/dispensar a partir deste valor, não aumentou significativamente a eficácia no processo de extração.

Figura 23. Otimização do número de ciclos aspirar/dispensar para as análises “in tube” SPME. Condições “in tube” SPME: amostra aquosa (0,5 mL) enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹, diluída com 0,5 mL de solução tampão borato (0.05 mol/L, pH 9.0); 100µL de amostra foi aspirada/dispensada com fluxo de 625 µL min⁻¹.

O fluxo do processo aspirar/dispensar está diretamente relacionado com o tempo total requerido para alcançar o equilíbrio de partição, onde a sensibilidade máxima é alcançada. Este tempo, expresso pela equação 4 (item 1.4.2.), é elevado quando utiliza-se capilares de grande comprimento (L), quando as constantes de afinidade (K_A) entre fármaco e fase extratora são altas, ou ainda, no caso de grandes volumes de fase extratora (V_f). Por outro lado, o tempo de extração é inversamente proporcional ao volume morto da tubulação (V_M) e ao fluxo da amostra. Como durante a extração as dimensões L , V_f , V_M e valores de K_A foram fixas, o tempo de extração dependeu apenas do fluxo da amostra durante o processo “in tube” SPME⁵⁹.

Para confirmar este efeito, três diferentes fluxos foram avaliados: 125, 315 e 625 $\mu\text{L min}^{-1}$, e suas respectivas eficiências de extração comparadas, utilizando-se 15 ciclos aspirar/dispensar.

No processo “in tube” SPME é esperado maior sensibilidade analítica quando utiliza-se pequenos fluxos ($\leq 100 \mu\text{L min}^{-1}$)^{52 - 55}, favorecendo a transferência de massa do analito, da amostra para a fase extratora.

Segundo a Figura 24, não foi observada grande variação na eficiência da extração nos diferentes fluxos avaliados. Provavelmente, no fluxo de 125 $\mu\text{L min}^{-1}$ (menor fluxo do injetor automático), o equilíbrio de partição já tenha sido atingido. Porém, levando-se em conta que não existe perda na sensibilidade analítica com o aumento do fluxo, e para evitar a formação de bolhas na tubulação do equipamento, optou-se pelo fluxo médio, de 315 $\mu\text{L min}^{-1}$, obtendo-se assim boa sensibilidade em menor tempo de análise.

Figura 24. Otimização do fluxo para as análises “in tube” SPME. Condições “in tube” SPME: amostra aquosa (0,5 mL) enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL^{-1} , diluída com 0,5 mL de solução tampão borato (0.05 mol/L, pH 9.0); 100 μL de amostra foi aspirada/dispensada durante 15 ciclos.

Na tentativa de aumentar a eficiência da extração “in tube” SPME e/ou diminuir o número de ciclos programados, foi inserida a etapa “aguardar” entre os comandos “aspirar” e “dispensar” no programa utilizado (Tabela 5). Desta forma, a amostra permaneceu maior tempo em contato com a fase extratora do capilar (30, 60 e 120 segundos). Porém, observou-se que não ocorreu aumento significativo na eficiência de extração. Pelo contrário, no caso da mirtazapina e sertralina, houve diminuição da quantidade de analito extraído. O efeito do tempo de contato entre a amostra e a fase extratora do capilar no processo de “in tube” SPME está ilustrado na Figura 25.

Figura 25. Otimização do tempo de contato da amostra com a fase extratora do capilar para as análise “in tube” SPME. Condições “in tube” SPME: amostra aquosa (0,5 mL) enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹, diluída com 0,5 mL de solução tampão borato (0.05 mol/L, pH 9.0); 100µL de amostra foi aspirada/dispensada durante 15 ciclos, com fluxo de 625 µL min⁻¹.

Baseando-se nos resultados experimentais, as melhores condições, entre as investigadas, para o processo “in tube” SPME foram as seguintes: extrações realizadas com o capilar de OV-1701 (250 µm x 80 cm), 0,5 mL da amostra aquosa enriquecida com os

fármacos e diluída com 0,5 mL de solução tampão borato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 9,0), sendo que apenas 100 μL da amostra foram aspirados/dispensados, durante 15 ciclos com fluxo de $315 \mu\text{L min}^{-1}$. A dessorção dos fármacos foi realizada pela passagem da própria fase móvel pelo capilar, após a mudança da posição da válvula Rheodyne, carregar para injetar.

4.3.2. PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS

Antes da validação analítica do método “in tube” SPME, foram avaliados dois procedimentos (adição de ácido acético 1% (v/v) ou de acetonitrila) para a precipitação de proteínas do plasma. A eficiência dos processos de precipitação foi avaliada através de análises de amostras de plasma branco de referência.

Segundo a Figura 26, a alta intensidade dos picos interferentes, compostos endógenos do plasma, principalmente as proteínas, evidencia a baixa eficiência do processo de precipitação das proteínas pela adição de solução de ácido acético 1% (v/v). Com a adição de acetonitrila, os interferentes apresentaram menor intensidade e não co-eluíram com os picos dos antidepressivos analisados. Portanto, o processo de precipitação de proteínas realizado através da adição de acetonitrila foi selecionado para dar continuidade aos experimentos.

Figura 26. Cromatogramas referentes às análises de amostras de plasma branco de referência após diferentes procedimentos de precipitação de proteínas.

A precipitação de proteínas com acetonitrila foi também realizada após a adição dos antidepressivos às amostras de plasma, com o intuito de avaliar a perda dos analitos durante o processo de precipitação. Este procedimento é importante, pois garante a eficácia do método “in tube” SPME/LC na análise dos antidepressivos em amostras de plasma de pacientes. A mesma metodologia de precipitação de proteínas descrita no item 3.5.4. foi utilizada, porém, partindo-se de uma amostra de plasma já contendo os antidepressivos em concentrações equivalente a 500 ng mL⁻¹.

A tabela 10 ilustra os valores de recuperação dos analitos, extraídos pelo método “in tube” SPME/LC, após o processo de precipitação de proteínas, realizado na presença e na ausência dos antidepressivos nas amostras de plasma. Observou-se que não houve perda significativa dos analitos durante o processo de precipitação.

Tabela 10. Influência do processo de precipitação de proteínas do plasma na perda dos analitos da amostra.

Antidepressivos	Recuperação (%)	
	A*	B*
Mirtazapina	5,3	5,3
Citalopram	12,6	13,9
Paroxetina	33,9	31,4
Duloxetina	42,6	38,8
Fluoxetina	41,9	46,8
Sertralina	43,5	44,9

* Valores de recuperação das extrações “in tube” SPME/LC, após processo de precipitação de proteínas realizado em amostra de plasma. A: precipitação realizada antes da adição dos antidepressivos; B: precipitação realizada após adição dos antidepressivos.

4.3.3. VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO “in tube” SPME/LC.

Para a validação analítica do método “in tube” SPME/LC padronizado, os seguintes parâmetros foram avaliados: especificidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, linearidade e recuperação.

A especificidade (seletividade) do método “in tube” SPME/LC é demonstrada pelos seguintes cromatogramas: amostra plasma branco de referência (Figura 27) e amostra de plasma de referência enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹ (Figura 28). Nestes cromatogramas não foram observadas interferências significativas (componentes endógenos) nos tempos de retenção dos analitos.

Figura 27. Cromatograma referente à análise “in tube” SPME/LC de amostra de plasma branco de referência.

Figura 28. Cromatograma referente à análise “in tube” SPME/LC de amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL^{-1} .

A precisão inter-ensaios do método padronizado (“in tube” SPME/LC) foi determinada utilizando-se amostras de plasma (branco de referência) enriquecidas com os fármacos nas concentrações referentes ao LQ, 200, 300 e 500 ng mL^{-1} (Tabela 11). Os coeficientes de variação nas três concentrações analisadas foram menores que 10%, para todos os fármacos estudados, demonstrando que o método proposto pode ser utilizado na quantificação destes antidepressivos, em concentrações referentes às encontradas em amostras de plasma de pacientes em terapia com os antidepressivos.

As recuperações absolutas foram avaliadas em replicatas ($n = 5$) a partir das amostras de plasma enriquecidas com padrões analíticos que resultaram na concentração de 500 ng mL^{-1} (Tabela 11). Os valores encontrados não foram próximos a 100%, no entanto, o método padronizado apresentou sensibilidade analítica e precisão adequados à monitorização terapêutica. As taxas de recuperação dos antidepressivos analisados pelo método “in tube” SPME/LC foram significativamente superiores, quando comparadas às recuperações em

SPME/LC. Este fato evidencia que o processo de partição “in tube” SPME foi mais eficiente que o processo de adsorção SPME, o que pode ser explicado através da maior afinidade dos antidepressivos pela fase extratora do capilar de OV-1701, frente à fase extratora de PDMS/DVB, ou ainda, em razão da maior quantidade de fase extratora presente no capilar, propiciando um maior número de interações entre os fármacos e a fase extratora.

Tabela 11. Precisão inter-ensaio e valores de recuperação absoluta para o método “in tube” SPME/LC em amostras de plasma.

Antidepressivos	Concentração Adicionada (ng mL⁻¹)	$\bar{X} \pm DP$ (ng mL⁻¹)	CV (%) n = 5	Recuperação (%) n = 5 (500 ng mL⁻¹) ($\bar{X} \pm DP$)
Mirtazapina	50 (LQ)	47,7 ± 5,9	9,40	5,32 ± 1,8
	200	194,3 ± 10,3	5,30	
	300	292,4 ± 12,5	4,30	
	500	505,1 ± 20,9	4,14	
Citalopram	50 (LQ)	46,3 ± 3,1	6,67	12,6 ± 2,1
	200	188,8 ± 11,0	5,85	
	300	313,4 ± 12,3	3,94	
	500	496,1 ± 5,8	1,20	
Paroxetina	50 (LQ)	51,2 ± 3,9	7,80	33,9 ± 2,7
	200	200,4 ± 6,1	3,03	
	300	288,9 ± 3,6	1,25	
	500	505,6 ± 12,4	2,47	
Duloxetina	20 (LQ)	22,3 ± 1,2	4,17	42,7 ± 4,3
	200	194,8 ± 8,9	4,60	
	300	284,0 ± 5,2	1,83	
	500	511,0 ± 8,3	1,64	
Fluoxetina	40 (LQ)	39,2 ± 3,9	7,80	41,9 ± 1,6
	200	193,4 ± 7,7	3,97	
	300	297,4 ± 12,2	4,12	
	500	503,0 ± 14,3	2,85	
Sertralina	40 (LQ)	43,0 ± 2,8	6,00	43,5 ± 1,5
	200	205,8 ± 14,0	6,84	
	300	305,8 ± 9,0	2,96	
	500	495,8 ± 23,2	6,70	

*LQ: Coeficiente de variação na concentração correspondente ao limite de quantificação;
 $\bar{X}$: concentração média determinada; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

O limite de quantificação (LQ) dos antidepressivos investigados, em plasma, variou de 20 ng mL⁻¹ a 50 ng mL⁻¹ (Tabela 12). Este limite foi determinado como sendo a menor concentração da curva de calibração com coeficiente de variação (precisão) menor que 10% (Tabela 11). Já o limite de detecção (LD), correspondente ao sinal analítico superior a três vezes o ruído da linha de base, variou de 5 ng mL⁻¹ a 20 ng mL⁻¹ (Tabela 12). Apesar da equivalência entre os valores de LD e LQ para ambos os métodos, é importante salientar que em “in tube” SPME, o volume de amostra foi a metade daquele utilizado em SPME, ou seja, 0,5 mL.

Tabela 12. Regressão linear, LQ e LD para o método “in tube” SPME/LC em amostras de plasma.

Antidepressivos	Regressão linear ($y = ax + b$)			LD (ng mL ⁻¹)	LQ (ng mL ⁻¹)
	LQ [*] – 500 ng mL ⁻¹				
	a	b	r ²		
Mirtazapina	1,017 ± 0,017	- 6,975 ± 5,372	0,9997	20,0	50,0
Citalopram	1,010 ± 0,038	- 3,959 ± 11,891	0,9985	20,0	50,0
Paroxetina	1,006 ± 0,026	- 2,532 ± 8,154	0,9993	20,0	50,0
Duloxetina	1,014 ± 0,039	- 5,622 ± 12,079	0,9985	5,0	20,0
Fluoxetina	1,011 ± 0,012	- 4,528 ± 3,876	0,9998	10,0	40,0
Sertralina	0,984 ± 0,013	6,771 ± 4,051	0,9998	20,0	40,0

*LQ: Concentração que corresponde ao limite de quantificação.

As curvas de calibração, ou analíticas, para cada antidepressivo, contemplando 4 valores de concentrações (LQ, 200, 300 e 500 ng mL⁻¹) estão ilustradas na Figura 29.

Figura 29. Curvas de calibração do método “in tube” SPME/LC para análises de antidepressivos em amostras de plasma.

A linearidade do método SPME/LC foi determinada em amostra de plasma de referência enriquecida com os antidepressivos nas concentrações plasmáticas de 20 a

500 ng mL⁻¹ para a duloxetina, de 50 a 500 ng mL⁻¹ para a mirtazapina, citalopram e paroxetina, e de 40 a 500 ng mL⁻¹ para a fluoxetina e sertralina. Segundo normas da ANVISA, os valores de r^2 (coeficiente de regressão linear) deverão ser maiores que 0,98.

Os intervalos avaliados foram lineares com coeficientes de regressão linear maiores que 0,997 (Tabela 12) e coeficientes de variação menores que 15% em todos os casos. Estes resultados demonstram que o método desenvolvido permite a quantificação dos antidepressivos em uma ampla faixa de concentração.

O método “in tube” SPME/LC apresentou intervalo de linearidade e valores de LQ próximo aos descritos na literatura para os métodos clássicos, LLE/LC e SPE/LC, os quais analisaram os mesmos antidepressivos em amostras biológicas⁶⁹⁻⁷¹.

Baseado nos resultados de validação analítica, a metodologia de “in tube” SPME/LC padronizada permite a análise dos antidepressivos em níveis plasmáticos que contemplam o intervalo terapêutico.

4.3.4. ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PLASMA DE PACIENTES: APLICAÇÃO DO MÉTODO “in tube” SPME/LC.

Para a avaliação da eficácia do método “in tube” SPME/LC, padronizado e validado, para o uso clínico, este foi empregado para as análises das amostras de plasma de três pacientes idosos, as quais fazem uso dos antidepressivos duloxetina (Cymbalta® - 60 mg/dia), fluoxetina (Prozac® - 20 mg/dia) e sertralina (Zoloft® - 150 mg/dia), respectivamente.

O perfil dos picos cromatográficos e resolução dos antidepressivos foram similares aos obtidos nas análises de amostras de plasma branco enriquecidas com os analitos. Nenhuma interferência aparente foi observada nos tempos de retenção dos fármacos (Figura 30). As concentrações plasmáticas determinadas nas amostras dos pacientes foram as seguintes: 406 ng mL⁻¹ de duloxetina (Figura 30a), 314 ng mL⁻¹ de fluoxetina (Figura 30b) e 445 ng mL⁻¹ de sertralina (Figura 30c).

Figura 30. Análise “in tube” SPME/LC de amostras de plasma de pacientes em terapia com antidepressivos não-tricíclicos. (a) 406 ng mL⁻¹ de duloxetina; (b) 314 ng mL⁻¹ de fluoxetina; (c) 445 ng mL⁻¹ de sertralina.

5. COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS SPME E “IN TUBE” SPME PARA ANÁLISE DE ANTIDEPRESSIVOS NÃO-TRICÍCLICOS EM AMOSTRAS DE PLASMA.

Neste item, será realizada uma breve discussão sobre as vantagens e desvantagens referentes às técnicas de preparo de amostra avaliadas, SPME e “in tube” SPME.

Primeiramente, considerando o custo, o investimento financeiro inicial utilizado na aquisição da instrumentação, injetor automático, utilizada na técnica “in tube” SPME foi maior. Devemos também considerar que custo de cada análise é dependente da quantidade de solventes e reagentes gastos, energia elétrica e da vida útil da fibra e do capilar. As extrações SPME utilizaram solvente orgânico na etapa de dessorção e as extrações “in tube” SPME, na etapa de precipitação, porém em menor quantidade. Com relação às fibras e capilares, cada fibra SPME, foi utilizada aproximadamente em 80 extrações, resultando em custo superior ao capilar utilizado em “in tube” SPME. Não foi observada perda na eficiência do processo “in tube” SPME no decorrer das extrações.

O tempo requerido para as análises nos dois métodos mostrou-se discrepante. Para SPME, foram realizadas aproximadamente 5 extrações por dia, no entanto, para “in tube” SPME, foram realizadas 12 extrações diárias. Este fato pode ser explicado comparando-se os tempos de extração e dessorção dos dois métodos: em SPME, os processos de extração e dessorção foram realizados em 60 minutos, já para “in tube” SPME, este tempo não foi superior a 20 minutos. O tempo necessário para o processo de lavagem da fibra SPME também foi maior quando comparado com “in tube” SPME.

Outra vantagem do método “in tube” frente ao “off line” está relacionada ao volume de amostra utilizada. O primeiro método utilizou metade do volume de amostra e gerou resultados satisfatórios, referentes ao LD e LQ.

É importante salientar também que o método “in tube” SPME permite a automação das análises, onde apenas a etapa de precipitação de proteínas e adição das amostras aos frascos são realizados “off line”. Por esta razão, existe uma menor exposição do analista às amostras biológicas, além da diminuição de perda do analito durante o processo de extração, acarretando em maior precisão analítica. Muitas vezes, em SPME, foi necessária a repetição de algumas análises, que foram prejudicadas pela perda do analito ou mesmo devido a erros causados durante o experimento, como flutuações nas temperaturas de aquecimento e/ou agitação da amostra.

Talvez, a vantagem mais significativa das extrações realizadas na fibra foi o fato de não necessitar da etapa de precipitação de proteínas, pois a possível adsorção irreversível das proteínas na fase extratora das fibras SPME não foi verificada.

A tabela 13 resume, em termos operacionais, a comparação entre os métodos SPME e “in tube” SPME.

Tabela 13. Comparação entre os métodos SPME e “in tube” SPME na análise de antidepressivos em amostras de plasma.

Parâmetros	SPME	“in tube” SPME
Número de amostras analisadas por dia	5	12
Volume de amostra *	1 mL	0,5 mL
Volume de tampão *	4 mL	0,5 mL
Precipitação de proteínas	—	ACN / amostra (2:1, v/v)
Dessorção	ACN	Fase Móvel
Etapas “off line” *	5	2

* Para análise de uma amostra; ACN: acetonitrila.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

O método “in tube” SPME/LC, padronizado e validado, demonstrou eficiente na análise de antidepressivos não-tricíclicos em amostra de plasma, em concentrações equivalentes ao intervalo terapêutico, no entanto, outras investigações serão realizadas em estudo posterior.

No procedimento de precipitação de proteínas do plasma, por exemplo, a utilização de um solvente orgânico (acetonitrila), mesmo que em pequena quantidade, é um fator negativo para o método. Outros reagentes, como o ácido tricloroacético e acetato de amônio, serão avaliados.

Outras fases extratoras também serão avaliadas, a fim de se obter maior eficiência de extração, ou seja, maiores taxas de recuperação dos analitos. Estudos com as fases extratoras de RP18-Select B (mesma fase presente na coluna analítica utilizada neste trabalho) e alquil diol sílica, em diferentes proporções, poderão resultar em extrações mais eficientes, pois a fase de RP18-Select B se mostrou bastante eficiente no processo de separação dos antidepressivos analisados e a adição de partículas alquil diol sílica (ADS), contribuirá na eliminação das proteínas e outros compostos endógenos presentes no plasma.

Desta forma, a avaliação do método “in tube” SPME/LC terá continuidade nos próximos meses, e os resultados mais eficazes serão acrescentados neste trabalho para posterior publicação.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em razão da complexidade da amostra biológica utilizada neste estudo, o plasma humano, a etapa de preparo de amostra: “clean-up”, extração e pré-concentração dos analitos mostrou-se extremamente importante e necessária, no que se refere à eliminação de compostos interferentes e aumento da sensibilidade e seletividade analítica.

Segundo os resultados obtidos, os métodos de microextração propostos neste trabalho, SPME e “in tube” SPME, técnicas relativamente recentes, são promissores para as análises de rotina de fármacos em material biológico para fins de monitorização terapêutica. A minimização da quantidade de solvente orgânico utilizado e a re-utilização das fases extratoras são algumas vantagens encontradas para ambos os métodos, frente às técnicas clássicas de extração: LLE e SPE.

Assim como todos os métodos de extração, a SPME e a “in tube” SPME possuem algumas variáveis que deverão ser otimizadas, para a obtenção de eficiente processo de extração. Com relação à SPME, destaca-se a otimização das variáveis: tempo e temperatura de extração e dessorção, pH da matriz, fase extratora e força iônica. Já para “in tube” SPME, o pH da matriz, o número e velocidade dos ciclos aspirar/dispensar, bem como o volume de amostra aspirada e dispensada.

A diluição da amostra de plasma com solução tampão, além de favorecer o processo de extração, através do ajuste do pH da matriz, diminuiu a influência das proteínas no processo de extração para ambas as técnicas de preparo de amostra. Para a técnica “in tube” SPME, foi necessária a etapa de precipitação de proteínas, anterior ao processo de extração, para evitar a co-eluição de compostos endógenos e analitos, bem como o bloqueio do capilar.

A técnica “in tube” SPME, quando comparada à SPME, permitiu a automação das análises, menor exposição do analista às amostras biológicas e solventes orgânicos, menor tempo de análise e menor volume de amostra de plasma.

Os limites de detecção, limites de quantificação e linearidade obtidos para os métodos desenvolvidos foram semelhantes aos determinados para os métodos clássicos de extração. A linearidade de ambos os métodos, do LQ a 500 ng mL⁻¹, possibilitou a análise dos analitos em concentrações correspondentes ao intervalo terapêutico. Porém, o método “in tube” SPME/LC apresentou melhores resultados de precisão e eficiência, ou seja, maiores taxas de recuperação. A eficácia dos métodos SPME/LC e “in tube” SPME/LC, padronizados e validados, foram comprovados através das análises de amostras de pacientes em terapia com os antidepressivos estudados.

Segundo os parâmetros de validação analítica avaliados, os métodos SPME/LC e “in tube” SPME/LC, padronizados, podem ser aplicados na análise de antidepressivos não-tricíclicos (mirtazapina, citalopram, paroxetina, duloxetina, fluoxetina e sertralina) em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica.

8. REFERÊNCIAS

1. FLECK, M. P. A., SOURGEY, E. B., DEL PORTO, J. A., BRASIL, M. A., JURUENA, M. F. Diretrizes da Associação Médica Brasileira para o tratamento da depressão. Rev. Bras. Psiquiatr. vol.25, n.2, 114 -122, 2003.
2. MORENO, R. A., MORENO, D. H. e SOARES, M. B. M. Psicofarmacologia de antidepressivos. Rev. Bras. Psiquiatr. vol.21, supl.1, 24-40, 1999.
3. MAREK, G. J., CARPENTER, L. L., MCDOUGLE, C. J., PRICE, L. H. Synergistic Action of 5-HT_{2A} Antagonists and Selective Serotonin Reuptake Inhibitors in Neuropsychiatric Disorders. Neuropsychopharmacology. vol 28, 402-412, 2003.
4. GOODNICK, P.J., GOLDSTEIN, B.J. Selective serotonin reuptake inhibitors in affective disorders: Basic pharmacology. J Psychopharmacol. vol 12, n 3 suppl B, 3-20, 1998.
5. TITIER, K., CASTAING, N., SCOTTO-GOMEZ, E., PEHOURCQ F., MOLIMARD, M. High-Performance Liquid Chromatographic Method with Diode Array Detection for Identification and Quantification of the Eight New Antidepressants and Five of Their Active Metabolites in Plasma after Overdose. Ther. Drug Monit. vol 25, 581-587, 2003.
6. CACCIA, S. Metabolism of the Newer Antidepressants: An Overview of the Pharmacological and Pharmacokinetic Implications. Clin. Pharmacokinet. vol. 34, n. 4, 281-302, 1998.
7. GREIST, J., MACNAMARA, R. K., MALLINCKRODT, C. H., RAYAMAJHI, J. N., RASKIN, J. Incidence and Duration of Antidepressant-Induced Nausea: Duloxetine Compared with Paroxetine and Fluoxetine. Clinical therapeutics. vol. 26, n. 9, 1446 – 1455, 2004.
8. TAYLOR, W. J., ROBINSON J. D., SPIVEY-MILLER, S. Handbook of therapeutic monitoring. 2 ed. Cincinnati: Harvey Whitney Books Company, p. 1-10, 1993.
9. WORDEN, J. P. Therapeutic drug monitoring. Current Surgery, vol. 51, n. 7, 4299-4435, 1994.

- 10.** QUEIROZ, M. E. C., LANÇAS, F. M. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida “no tubo” e cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*. vol. 28, n. 5, 880 – 886, 2005.
- 11.** HACKETT, J., ELIAN, A. A. Extraction and analysis of flunitrazepam/7-aminoflunitrazepam in blood and urine by LC–PDA and GC–MS using butyl SPE columns. *Forensic Science International*. vol. 157, n. 2-3 , 156 -162 , 2006.
- 12.** 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*. vol. 804, 319-326, 2004.
- 13.** ERNY, G.L., CIFUENTES, A. Liquid separation techniques coupled with mass spectrometry for chiral analysis of pharmaceuticals compounds and their metabolites in biological fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. vol. 40, n. 3 , 509-515, 2006.
- 14.** KIM, I., DARWIN, W.D., HUETIS, M.A. Simultaneous determination of nicotine, cotinine, norcotinine, and *trans*-3'-hydroxycotinine in human oral fluid using solid phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*. vol. 814, n. 2 , 233-240, 2005.
- 15.** PAWLISZYN, J. Applications of solid phase microextraction. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999.
- 16.** PAWLISZYN, J. Theory of Solid-Phase Microextraction. *J. Chromatogr. Sci.* vol.38, 270-278, 2000.
- 17.** VALENTE, A. L. P., AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. *Química Nova*. vol. 24, nº 4, 2000.
- 18.** ARTHUR, C.L., KILLAM, L.M., BUCHHOLZ, D., PAWLISZYN, J. Automation and optimization of solid-phase microextraction. *Anal. Chem.*, v. 64, n.17, 1960 - 1966, 1992.
- 19.** PROSEN, H., ZUPANCIC-KRALJ, L. Solid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.* vol. 18, n. 4 272 - 282, 1999.

- 20.** QUEIROZ, M. E. C., SILVA, S. M., CARVALHO, D., LANÇAS, F. M. Comparison between solid-phase extraction methods for the chromatographic determination of organophosphorus pesticides in water. *J. Environ. Sci. Health.* vol. 36, n. 5, 517 - 527, 2001.
- 21.** SOUZA, D. A., LANÇAS, F. M. Solvents sample preparation for Pesticides Analysis in Environmental Water Samples Using Solid-Phase Microextraction-High Resolution Gas Chromatography/Mass Spectrometry (SPME-HRGC/MS). *J. Environ. Sci. Health.* vol. 38, n. 4, 417-428, 2003.
- 22.** LANÇAS, F. M., RODRIGUES, R., LACERDA, C. A. Coating of solid-phase microextraction fibers with chemically bonded silica particles: selective extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from drinking water samples. *J. Chromatogr. Sci.* vol. 40, n. 9, 489 – 494, 2002.
- 23.** QUEIROZ, M. E. C., CARVALHO, D., LANÇAS, F. M. Determination of lamotrigine simultaneously with carbamazepine, carbamazepine epoxide, phenytoin, phenobarbital, and primidone in human plasma by SPME–GC–TSD. *J. Chromatogr. Sci.* vol. 40, n. 4, 219 – 223, 2002.
- 24.** QUEIROZ, M. E. C., VALADÃO, C. A. A., FARIAS, A., CARVALHO, D., LANÇAS, F. M. Determination of amitraz in canine plasma by solid-phase microextraction–gas chromatography with thermionic specific detection. *J. Chromatogr. B.* vol. 794, n. 2, 337 – 342, 2003.
- 25.** QUEIROZ, M. E. C., LANÇAS, F. M. Practical Tips on Preparing Plasma Samples for Drug Analysis Using SPME. *LCGC North América.* vol. 22, n° 10, 2004.
- 26.** WALLS, M., MULLETT, W. M., PAWLISZYN, J. Monitoring of drugs and metabolites in whole blood by restricted-access solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* vol. 1025, n. 1, 85-92, 2004.
- 27.** JINNO, K.; TANIGUCHI, M.; HAYASHIDA M. Solid phase micro extraction coupled with semi-microcolumn high performance liquid chromatography for the analysis of benzodiazepines in human urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* v. 17, p. 1081, 1998.

- 28.** SUPELCO, Cromatografia – Produtos para análises e purificação (catálogo). Pág. 355, 2003-2004.
- 29.** QUEIROZ, M. E. C., SILVA, S. M., CARVALHO, D., LANÇAS, F.M. Solid-phase microextraction-liquid chromatography (SPME-LC) determination of lamotrigine simultaneously with carbamazepine and carbamazepine 10,11-epoxide in human plasma. J. Sep. Sci. vol.25, n. 1-2, 91- 95, 2002.
- 30.** ZAMBONIN, C. G., ARESTA, A., PALMISANO, F. Determination of the immunosuppressant mycophenolic acid in human serum by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography. J. Chromatogr. B. vol. 806, n. 2, 89-93, 2004.
- 31.** ARESTA, A., PALMISANO, F., ZAMBONIN, C. G. Determination of naproxen in human urine by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography. J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis. vol. 39, n. 3-4 , 643 – 647, 2005.
- 32.** CHOU, CHI -CHI, LEE MAW-RONG. Solid phase microextraction with liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry for analysis of amphetamine and methamphetamine in serum. Analytica Chimica Acta. Vol. 538, n. 1-2, 49-56, 2005.
- 33.** MAURER, H. H. Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology. Clinical Biochemistry. vol. 38, n. 4, 310-318, 2005.
- 34.** OLIVEIRA, A. R. M., CESARINO, E. J., BONATO, P. S. Solid-phase microextraction and chiral HPLC analysis of ibuprofen in urine. J. of Chromatogr. B. vol 818, n. 2, 285-291, 2005.
- 35.** THEODORIDIS G. Application of solid-phase microextraction in the investigation of protein binding of pharmaceuticals. J. Chromatogr. B. vol 830, n. 2 , 238-244, 2006.
- 36.** ALVES, C., FERNANDES, C., NETO, Á. J. S., RODRIGUES, J. C., QUEIROZ, M. E. C., LANÇAS, F. M. Optimization of the SPME parameters and its online coupling with HPLC

for the analysis of tricyclic antidepressants in plasma samples. J. Chromatogr. Sci. vol. 44, 1 - 7, 2006.

37. YUAN, H. Bioapplications of Solid Phase Microextraction. 2000. 201f. Tese (Doutorado em Filosofia da Química) – University of Waterloo – Ontário, Canadá, 2000.

38. SUPELCO, Cromatografia – Produtos para análises e purificação (catálogo). Pág. 352, 2003-2004.

39. LORD, H., PAWLISZYN, J. Microextraction of Drugs. J. Chromatogr. A. vol. 902, n. 1, 17-63, 2000.

40. ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. J. Chromatogr. A. vol. 902, n.1, 167-194, 2000.

41. KUMAZAWA, T., LEE, X. P., SATO, K., SUZUKI, O. Solid-phase microextraction and Liquid Chromatography / Mass Spectrometry in drug analysis. Anal. Chim. Acta. vol. 492, 49 – 67, 2003.

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

43. KATAOKA, H., LORD, H. L., PAWLISZYN, J. Simple and rapid determination of amphetamine, methamphetamine, and their methylenedioxy derivatives in urine by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. J. J. Anal. Toxicol.. vol. 24, n. 4, 257-265, 2000.

44. YUAN, H., MESTER, Z., LORD, H., PAWLISZYN, J. Automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the determination of selected benzodiazepines. J. Anal. Toxicol. vol. 24, n. 8, 718-725, 2000.

45. JINNO, K., KAWAZOE, M., SAITO, Y., TAKEICHI, T., HAYASHIDA, M. Sample preparation with fiber-in-tube solid-phase microextraction for capillary electrophoretic

separation of tricyclic antidepressant drugs in human urine. *Electrophoresis*. vol 22, n. 17, 3785-3790, 2001.

46. WALLES, M., MULLETT, W. M., LEVSEN, K., BORLAK, J., WUNSCH, G. PAWLISZYN, J. Verapamil drug metabolism studies by automated in-tube solid phase microextraction. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. vol 30, n. 2, 307-319, 2002.

47. MULLETT, W. M., LEVSEN, K., LUBDA, D., Pawliszyn, J. Biocompatible in-tube solid-phase microextraction capillary for the direct extraction and high-performance liquid chromatographic determination of drugs in human serum. *J. Chromatogr. A*. vol. 963. 325-334. 2002.

48. KUMAZAWA, T., LEE, X.-P., SATO, K., SUZUKI, O. Solid-phase microextraction and liquid chromatography/mass spectrometry in drug analysis. *Anal. Chim. Acta*. vol. 492, n° 1-2, 49-67, 2003.

49. FAN, Y., FENG, Y.-Q., DA, S.-L., SHI, Z.-G. Poly (methacrylic acid-ethylene glycol dimethacrylate) monolithic capillary for in-tube solid phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography and its application to determination of basic drugs in human serum. *Anal. Chim. Acta*. vol.523, n° 1, 251-258, 2004.

50. NIE, J., ZHANG, M., FAN, Y., WEN, Y., XIANG, B., FENG, Y.-Q. Biocompatible in-tube solid-phase microextraction coupled to HPLC for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma and urine. *J. Chromatogr. B*. vol. 828, n° 1-2, 62-69, 2005.

51. WEN, Y., FAN, Y., ZHANG, M., FENG, Y.-Q. Determination of camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in human plasma using polymer monolithic in-tube solid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem*. vol. 382, n° 1, 204-210, 2005.

52. FAN, Y., FENG, Y.-Q., ZHANG, J.-T., DA, S.-L., ZHANG, M. Zhang. Poly(methacrylic acid-ethylene glycol dimethacrylate) monolith in-tube solid phase microextraction coupled to

high performance liquid chromatography and analysis of amphetamines in urine samples. J. Chromatogr. A. vol.1074, n° 1-2, 9-16, 2005.

53. WEI, F., FAN, Y., ZHANG, M., FENG, Y.-Q. Poly(methacrylic acid-ethylene glycol dimethacrylate) monolith in-tube solid-phase microextraction applied to simultaneous analysis of some amphetamine derivatives in urine by capillary zone electrophoresis Electrophoresis. vol. 26, n° 16, 3141-3150, 2005.

54. FAN, Y., FENG, Y.-Q., Da, S.-L., WANG, Z.-H. In-tube solid phase microextraction using a β -cyclodextrin coated capillary coupled to high performance liquid chromatography for determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine samples. Talanta. vol. 65, n. 1, 111-117, 2005.

55. WU, J., LORD, H., PAWLISZYN, J. Determination of stimulants in human urine and hair samples by polypyrrole coated capillary in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. Talanta. vol. 54, n. 4, 655-672, 2001.

56. KATAOKA, H., LORD, H., YAMAMOTO, S., NARIMATSU, S., PAWLISZYN, J. Development of automated in-tube SPME/LC/MS method for drug analysis. Microcol. Sep. vol.12, n. 9, 493-500, 2000.

57. KATAOKA, H., LORD, H., PAWLISZYN, J. Automated in-tube solid-phase microextraction-liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the determination of ranitidine. J. Chromatogr B. vol. 731, n. 2, 353-359, 1999.

58. WU, J., LORD, H., PAWLISZYN, J., KATAOKA, H. Polypyrrole-coated capillary in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the determination of β -blockers in urine and serum samples. J. Microcol. Sep. vol.12, n.4, 255-266, 2000.

59. MULLETT, W. M., MARTIN, P., PAWLISZYN, J. In-Tube Molecularly Imprinted Polymer Solid-Phase Microextraction for the Selective Determination of Propranolol Anal. Chem. vol. 73, n.11, 2383-2389, 2001.

- 60.** LCResources. Getting started in HPLC – Section 1C. HPLC Instruments. Disponível em: <<http://www.lcresources.com/resources/getstart/1c01.htm>>. Acesso em 01 fev, 2007.
- 61.** CASS, Q. B., LUIZA, A. Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação. São Carlos: EdUFSCar, 2001. ISBN=85-85173-61-0.
- 62.** LCResources. Getting started in HPLC – Section 2E. HPLC detectors. Disponível em: <<http://www.lcresources.com/resources/getstart/2e01.htm>>. Acesso em 01 fev, 2007.
- 63.** ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução-RE nº 899, maio 2003.
- 64.** QUERIOZ, M.E.C., LANÇAS, F.M. Practical tips on preparing plasma samples for drug analysis using SPME. LCGC North America, vol. 22, p. 970, 2004.
- 65.** S. M. R., MAUDENS, K.E., VAN PETEGHEM, C. H., LAMBERT, W. E. E. Development of a solid phase extraction for 13 ‘new’ generation antidepressants and their active metabolites for gas chromatographic–mass spectrometric analysis. J. Chromatogr. A. vol. 1092, nº 1-2, 19-29, 2005.
- 66.** ULRICH, S., MARTENS, J. Solid-phase microextraction with capillary gas-liquid chromatography and nitrogen-phosphorus selective detection for the assay of antidepressant drugs in human plasma. J. Chromatogr. B. vol. 696, 217-234, 1997.
- 67.** BLASCO, C., FERNÁNDEZ, M., PICÓ, Y., FONT, G. Comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction for determining six organophosphorus insecticides in honey by liquid chromatography–mass spectrometry. J. Chromatogr. A. vol. 1030, n. 1-2, 77-85, 2004.
- 68.** SWARTZ, M. E., KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. Pharmaceutical Technology. Vol. 2, n. 3, 12-20, 1998.
- 69.** DUVERNEUIL, C., GRANDMAISON, G.L., MAZANCOURT, P., ALVAREZ, J.C. A High-Performance Liquid Chromatography Method with Photodiode-Array UV Detection for Therapeutic Drug Monitoring of the Nontricyclic Antidepressant Drugs. Ther. Drug Monit. vol. 25, 565-573, 2003.

- 70.** FRAHNERT, C., LUISE RAO, M., GRANMADER, K. Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring. *J. Chromatogr B.* vol. 794, 35-47 2003.
- 71.** EAP, C.B., BAUMANN, P. Analytical methods for the quantitative determination of selective serotonin reuptake inhibitors for therapeutic drug monitoring purposes in patients. *J. Chromatogr. B.* vol. 686, 51-63, 1996.
- 72.** MALFARÁ, W. R., BERTUCCI, C., QUEIROZ, M. E. C., CARVALHO, S. A. D., BINCHI, M. L. P., CESARINO, E. J., CRIPPA, J. A., QUEIROZ, R. H. C. Reliable HPLC method for therapeutic drug monitoring of commonly prescribed tricyclic and nontricyclic Antidepressants. *J. Pharm. Biomed. Anal.* "in press", 2007.
- 73.** LUNDMARK, J., BENGTSSON, F., NORDIN, C., REIS, M., WALINDER, J. Therapeutic drug monitoring of selective serotonin reuptake inhibitors influences clinical dosing strategies and reduces drug costs in depressed elderly patients. *Acta Psychiatr. Scand.* vol. 101, 354-359, 2000.
- 74.** MILLER, A., RABE-JABLONSKA, J. The efficacy of antidepressants in the treatment of chronic noncancer pain – a review. *Psychiatr Pol.* vol. 39, 21-32, 2005.

ANEXO 2