Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

“Desenvolvimento da fase extratora SPME de poli(pirrol) e avaliação das técnicas SPME/LC e SBSE/LC para análises de antidepressivos em amostras de plasma.”

Andréa Rodrigues Chaves

Orientadora: Maria Eugênia Queiroz Nassur

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

RIBEIRÃO PRETO -SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Chaves, Andréa Rodrigues

Desenvolvimento da fase extratora SPME de poli(pirrol) e avaliação das técnicas SPME/LC e SBSE/LC para análises de antidepressivos em amostras de plasma.”. Ribeirão Preto, 2008.

220 p.; 30cm

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

Orientadora: Nassur, Maria Eugênia Queiroz.

1. Microextração em fase sólida. 2. Extração sortiva em barra de agitação. 3. Cromatografia líquida. 4. Antidepressivos.

Dedicatória

Aos meus pais, Reynaldo e Ana Lúcia, ao meu irmão Anderson e minha Vó Terezinha (in memoriam), por todo carinho e amor nos momentos mais difíceis. Este trabalho também é de vocês! Amo vocês.

Agradecimentos

A Deus por me conceder a graça de conhecer pessoas tão generosas que possibilitaram minha evolução.

Ao Sílvio por todo carinho, companheirismo e compreensão e por ter sempre um sorriso certo nas horas incertas.

Meu amor, muito obrigada!

“A ausência diminui as paixões mediocres e aumenta as grandes, assim como o vento apaga as velas, mas atiza as fogueiras.”

A toda minha família que de longe ou perto nunca deixou que me faltasse amor.

A minha nova família D. Minervina, Sr. Vavá, Sílvia e Sócrates.

A Professora Maria Eugênia, muito obrigada por acreditar e investir na minha formação profissional. Por ser algumas vezes mãe, outras vezes irmã e amiga, mas acima de tudo por ser sempre profissional.

“Um professor sempre afeta a eternidade. Ele nunca saberá onde sua influência termina.” (Henry Adams)

Ao Professor Glaíco Chiericato Júnior por me ensinar engatinhar nos caminhos da ciência.

A Professora Regina Helena Costa Queiroz e a Soninha do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela ajuda essencial no início deste trabalho.

Aos amigos de hoje e sempre do 2°C & Associados, Alíne, Paulo, Henrique, Karina, Suzi, Zé, Marina, Daniel, Milena e Bereta. Obrigada por tornar os dias de ontem inesquecíveis e me fazer desejar os de amanhã!

Muito obrigada também a Tia Cidinha e ao Tio João, por todas as palavras de incentivo e afeto, além dos sábios conselhos!

*Aos amigos que eu tive a sorte de conhecer em Ribeirão Preto:
Marina, Jamanta, Bruno, Rê, Fernanda, Ana Paula, Chico,
Lú, Juliano, Ivy, Rick, Lucas, Luana, Marcela, Rodrigo, Thaty,
Gisele, Mari, Claudita, Mirko, Andréia, Flávia, Evandro e
Virgílio.*

*A família Aguiar: Karô, D. Sonia, Sr. Sebastião, Cláudio, Nene
e Tai. E também a família Levada: Jú, Betinho, Leli, Luís e
Binho. Obrigada por me fazer sentir parte da família de
você.*

*Ao casal de amigos que eu tanto admiro Geslaine e Ernando, e
sua filhinha fofa Heloísa.*

*Aos colegas de grupo Bruno, Lídervan, Fernanda, Ana Paula,
Juciene e Fernandinha. Obrigada por toda paciência e
compreensão!*

A Professora Karen pelo auxílio com a correção gramatical.

*Aos funcionários do Departamento de Química por terem sido
tão pacientes e prestativos comigo, principalmente a Lâmia,
Mércia, Verinha e Lozane.*

*Ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e
Letras de Ribeirão Preto e ao programa de pós-graduação
pela oportunidade de realizar este trabalho.*

Ao CNPq pelo auxílio financeiro concedido.

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

*Se as coisas são
inatingíveis... ora! Não é
motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se
não fora a presença
distante das estrelas!*

(Manuel Bandeira)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	xviii
LISTA DE SIGLAS E ABREVEATURAS.....	xix
RESUMO	xxi
SUMMARY	xxiv
CAPITULO I.....	1
I.1.1 Depressão	1
I.1.2 Depressão em Idosos.....	3
I.1.3 Antidepressivos	5
I.1.3.1 Antidepressivos Tricíclicos (ADTs)	6
I.1.3.2 Inibidores Enzimáticos	8
I.1.3.3.a Inibidores da Monoamino Oxidase (MAOs)	8
I.1.3.3.b Inibidores reversíveis da monoamino oxidase A (RIMA).....	9
I.1.3.4 Inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRIs)	10
I.1.3.5 Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina (SNRIs)	12
I.1.3.6 Receptores Noradrenérgico e Serotonérgico (NaSSa)	14
I.1.4 Monitorização terapêutica	16
I.1.5 Métodos Analíticos	17
I.2 OBJETIVOS.....	22
I.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
CAPÍTULO II.....	33
II.1.1 Extração sortiva em barra de agitação	33
II.1.1.1 Princípios teóricos da SBSE.....	34

II.1.1.2 Procedimento de Extração	39
II.1.1.3 Otimização do Processo SBSE	43
II.1.1.4 Análises Quantitativas.....	44
II.1.1.5 Derivatizações	45
II.1.1.6 Aplicações	46
II.2 OBJETIVOS.....	49
II.3 MATERIAIS E MÉTODOS	50
II.3.1 Padrões analíticos e reagentes.....	50
II.3.2 Amostras de plasma de referência	50
II.3.3 Amostras de plasmas de pacientes	51
II.3.4 Acessórios SBSE	51
II.3.5 Condições cromatográficas SBSE/LC-UV	52
II.3.6 Otimização do processo SBSE	53
II.3.7 Validação analítica do método SBSE/LC-UV para análise simultânea de antidepressivos	54
II.3.7.1 Linearidade	55
II.3.7.2 Recuperação.....	55
II.3.7.3 Precisão inter ensaio	56
II.3.7.4 Exatidão.....	57
II.3.7.5 Limite de Quantificação.....	57
II.3.7.6 Seletividade.....	58
II.4.1 Condições cromatográficas LC-UV	59
II.4.2 Padronização do método SBSE/LC-UV para análise simultânea de antidepressivos	66
II.4.2.1 Otimização do tempo e da temperatura de extração	66
II.4.2.2 Influência da força iônica	74
II.4.2.3 Influência do pH da matriz	74
II.4.2.4 Dessorção	75
II.4.2.5 Condições Otimizadas	77
II.4.3 Validação analítica.....	78

II.4.3.1 Seletividade do método SBSE/LC-UV	79
II.4.3.2 Linearidade	84
II.4.3.3 Limite de Quantificação (LOQ)	85
II.4.3.4 Recuperação relativa, exatidão e precisão inter ensaio	87
II.4.4 Aplicabilidade do método SBSE/LC-UV	88
II.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
II.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
CAPÍTULO III.....	101
III. 1. INTRODUÇÃO	101
III.1.1 Microextração em Fase Sólida (SPME)	101
III.1.1.1 Princípios Teóricos da SPME	101
III.1.1.2 Aspectos Práticos	105
III.1.1.3 Otimização das variáveis SPME	112
III.1.1.3a Temperatura de extração	112
III.1.1.3b Força iônica	112
III.1.1.3c Tempo de extração	113
III.1.1.3d pH da matriz	114
III.1.1.3f Dessorção	114
III.1.1.3g Agitação	115
III.1.1.3h Fase extratora	115
III.1.2 Poli(pirrol) como fase extratora para SPME	116
III.2 OBJETIVOS	121
III.3 MATERIAIS E MÉTODOS	122
III.3.1 Padrões analíticos e reagentes	122
III.3.2 Amostras de plasma de referência	123
III.3.3 Amostras de plasmas de pacientes	123
III.3.4 Eletrodeposição do filme de poli(pirrol) em eletrodo de aço inox	123
III.3.4.1 Sistema de purificação de nitrogênio	123

III.3.4.2 Desenvolvimento da fibra SPME com a fase extratora de poli(pirrol)	124
III.3.4.3 Microscopia eletrônica de varredura	126
III.3.5 Otimização das variáveis SPME	126
III.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	129
III.4.1 Eletropolimerização do filme de poli(pirrol) em eletrodo de aço inox	129
III.4.2 Padronização do método SPME–PPY/LC-UV para análise simultânea de antidepressivos em amostras de plasma	147
III.4.2.2 Otimização do tempo e temperatura de extração	148
III.4.2.3 Mecanismo de extração	153
III.4.2.4 Influência da força iônica	155
III.4.2.5 Dessorção “off-line”	155
III.4.2.6 Otimização do volume de amostra	156
III.4.2.7 Condições SPME otimizadas	158
II.4.3 Validação analítica do método SPME–PPY/LC-UV.....	159
III.4.3.1 Seletividade do Método SPME–PPY/LC-UV.....	159
III.4.3.2 Linearidade do Método SPME –PPY/LC - UV	163
III.4.3.3 Limite de quantificação.....	164
III.4.3.4 Recuperação, Precisão Inter Ensaio e Exatidão	165
III.4.4 Aplicabilidade do método SPME–PPY/LC	167
III CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	171
III.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	172
ANEXOS.....	180
ANEXO 1: Espectros UV – vis (SBSE/LC-UV).....	180
ANEXO 2: Curvas Analítica (SBSE/LC-UV).....	182
ANEXO 3: Espectros UV-vis (SPME-PPY/LC-UV).....	185
ANEXO 4: Curvas Analítica (SPME-PPY/LC-UV).....	188
ANEXO 5: Currículo	191

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1. Representação estrutural dos antidepressivos tricíclicos.....	7
Figura I.2. Representação estrutural da moclobemida.	9
Figura I.3. Representação estrutural de alguns antidepressivos SSRIs. ..	12
Figura I.4. Representação estrutural da duloxetine.....	13
Figura I.5. Representação estrutural da mirtazapina.....	14
Figura II.1. Estrutura do oligômero de PDMS.	34
Figura II.2. Ilustração da barra de agitação magnética com o recobrimento de PDMS.....	37
Figura II.3. Modo de extração SBSE.	39
Figura II.4. Princípio de extração SBSE.	41
Figura II.5. Dessorção líquida “off-line” SBSE.....	43
Figura II.6. Barra de extração sortiva revestida com PDMS.....	52
Figura II.7. Cromatograma referente à análise da solução padrão dos antidepressivos (500 ng mL ⁻¹). Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L ⁻¹ , acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV λ = 230 nm. .	65
Figura II.8. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para a sertralina. Condições SBSE: amostra de plasma enriquecido com os antidepressivos (500 ng mL ⁻¹) diluída com solução tampão borato 0,05 mol L ⁻¹ pH 9,0. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L ⁻¹ , acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV λ = 230 nm.	67
Figura II.9. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para o citalopram. Condições SBSE: amostra de plasma enriquecido com os antidepressivos (500 ng mL ⁻¹) diluída com solução tampão borato 0,05 mol L ⁻¹ pH 9,0; 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em	

acetonitrila 50°C, 15 minutos. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV λ = 230 nm. **.68**

Figura II.10. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para a clomipramina. Condições SBSE: amostra de plasma enriquecido com os antidepressivos (500 ng mL⁻¹) diluída com solução tampão borato 0,05 mol L⁻¹ pH 9,0, 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em acetonitrila 50°C, 15 minutos. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV λ = 230 nm.**.68**

Figura II.11. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para imipramina. Condições SBSE: amostra de plasma enriquecido com os antidepressivos (500 ng mL⁻¹) diluída com solução tampão borato 0,05 mol L⁻¹ pH 9,0, 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em acetonitrila 50°C, 15 minutos. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV λ = 230 nm. **.69**

Figura II.12. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para a mirtazapina. Condições SBSE: 4 mL de solução tampão borato pH 9,0, 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em acetonitrila 50°C, 15 minutos. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV λ = 230 nm.....**.69**

Figura II.13. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para a paroxetina. Condições SBSE: 4 mL de solução tampão borato pH 9,0, 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em acetonitrila 50°C, 15 minutos. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV λ = 230 nm.....**.70**

Figura II.14. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para a amitriptilina. Condições SBSE: 4 mL de solução tampão borato pH 9,0, 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em acetonitrila 50°C, 15 minutos. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV λ = 230 nm.....**701**

Figura II.15. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para a fluoxetina. Condições SBSE: 4 mL de solução tampão borato pH 9,0, 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em acetonitrila 50°C, 15 minutos. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV λ = 230 nm.....**73**

Figura II.16. Efeito da adição de sal à matriz no processo SBSE para a análise de antidepressivos em amostras de plasma. Condições SBSE: 4 mL de solução tampão borato pH 9,0, 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em acetonitrila 50°C, 15 minutos. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV λ = 230 nm.**73**

Figura II.17. Influência do pH da matriz na eficiência do processo SBSE. AMI- amitriptilina, PAR- paroxetina, IMI- imipramina, SER- sertralina, CIT- citalopram, FLU- fluoxetina, MIR- mirtazapina e CLO- clomipramina. Condições SBSE: 4 mL de solução tampão borato pH 9,0, 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em acetonitrila 50°C, 15 minutos. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV λ = 230 nm.....**75**

Figura II.18. Influência do processo de dessorção na eficiência do processo SBSE. Área do pico do antidepressivo em função do tempo de dessorção SBSE. AMI- amitriptilina, PAR- paroxetina, IMI- imipramina, SER- sertralina, CIT- citalopram, FLU- fluoxetina, MIR- mirtazapina e

CLO- clomipramina. Condições SBSE: 4 mL de solução tampão borato pH 9,0, 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em acetonitrila 50°C, 15 minutos. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV λ = 230 nm.76

Figura II.19. Cromatograma referente à análise SBSE/LC-UV da amostra de plasma branco de referência enriquecido com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹ diluída em solução tampão borato pH 9,0, 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em acetonitrila 50°C, 15 minutos. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV λ = 230 nm.80

Figura II.20. Cromatograma referente à análise SBSE/LC-UV da amostra de plasma branco de referência diluída em solução tampão borato pH 9,0, 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em acetonitrila 50°C, 15 minutos Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV λ = 230 nm.81

Figura II.21. Cromatograma referente à análise SBSE /LC-UV da amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos nas concentrações do limite de quantificação fluoxetina. Condições SBSE: 4 mL de solução tampão borato pH 9,0, 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em acetonitrila 50°C, 15 minutos Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v). Coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV λ = 230 nm.....85

Figura II.22 A. Cromatograma referente à análise SBSE/LC-UV da amostra de plasma de paciente em terapia com o antidepressivo fluoxetina, diluída em solução tampão borato pH 9,0, 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em acetonitrila 50°C, 15 minutos Condições

cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV λ = 230 nm.90

Figura II.22 B. Cromatograma referente à análise SBSE / LC - UV da amostra de plasma de paciente em terapia com o antidepressivo paroxetina, diluída em solução tampão borato pH 9,0, 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em acetonitrila 50°C, 15 minutos Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV λ = 230 nm.91

Figura II.22 C. Cromatograma referente à análise SBSE/LC da amostra de plasma de paciente em terapia com o antidepressivo sertralina, diluída em solução tampão borato pH 9,0, 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em acetonitrila 50°C, 15 minutos Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV λ = 230 nm.92

Figura III.1. 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.102

Figura III.2. 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.....102

Figura III.3. Procedimento SPME, (A) extração direta e (B) extração em fase gasosa (“headspace”).106

Figura III.4. Dessorção térmica dos compostos extraídos por SPME para a análise por GC.107

Figura III.5. Interface SPME/LC.....108

Figura III.6. Dessorção “off-line” da técnica SPME.109

Figura III.7. Mecanismo de oxidação do pirrol.118

Figura III.8. Sistema de purificação de N ₂	124
Figura III.9. Representação esquemática da célula eletroquímica utilizada neste trabalho.	125
Figura III.10. Voltamograma cíclico obtido em meio de acetonitrila e perclorato de lítio 0,1 mol L ⁻¹ , utilizando velocidade de varredura de 10 mV. Eletrodo de trabalho: aço inox 316, eletrodo de referência; calomelano saturado, eletrodo auxiliar: fio de platina, célula eletroquímica com capacidade máxima de 10 mL.	130
Figura III.11. Voltamograma cíclico do pirrol 0,01 mol L ⁻¹ em meio de acetonitrila e perclorato de lítio 0,1 mol L ⁻¹ , com velocidade de varredura 10mV em 200 ciclos. Eletrodo de trabalho: aço inox 316, eletrodo de referência; calomelano saturado, eletrodo auxiliar: fio de platina, célula eletroquímica com capacidade máxima de 10 mL.....	132
Figura III.12. Voltamograma cíclico em meio de acetonitrila e ácido sulfúrico 0,05 mol L ⁻¹ , utilizando velocidade de varredura de 10 mV. Eletrodo de trabalho: fio de aço inox 316, eletrodo de referência padrão de hidrogênio, eletrodo auxiliar: fio de platina espiralado, célula eletroquímica com capacidade máxima de 50 mL.....	133
Figura III.13. Voltamograma Cíclico do pirrol 0,01 mol L ⁻¹ em meio de acetonitrila e ácido sulfúrico 0,05 mol L ⁻¹ , utilizando eletrodo de aço inox 316 com velocidade de varredura 10mV em 200 ciclos. Eletrodo de trabalho: fio de aço inox 316, eletrodo de referência padrão de hidrogênio, eletrodo auxiliar: fio de platina espiralado, célula eletroquímica com capacidade máxima de 50 mL.	134
Figura III.14. Cromatograma referente à análise SPME-PPY/LC-UV utilizando eletrodo de aço 316 com filme de PPY eletrodepositado em meio eletrolítico de ácido sulfúrico. Condições de extração: amostra enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL ⁻¹ diluída em solução borato 0,05 mol L ⁻¹ , pH 9,0, agitação de 1100 rpm, por 45 minutos a 50°C. Dessorção em 3 mL de acetonitrila por 20 minutos a 50°C. 1 – moclobemida, 2 – fenacetina (padrão interno), 3 – paroxetina, 4 –	

mirtazapina, 5 – fluoxetina e 6 – clomipramina. Condições cromatográficas: fase móvel empregada: tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 3,8 e acetonitrila nas proporções (57: 43, v/v), coluna C18 Lichrospher RP-select B e detector UV-vis (λ = 230 nm).....**135**

Figura III.15. Voltamograma cíclico da solução eletrolítica (acetonitrila e perclorato de lítio 0,1 mol L⁻¹), com velocidade de varredura de 10mV. Condições eletroquímicas: eletrodo de trabalho, aço inox 316; contra-eletrodo, fio de platina espiralado; eletrodo de referência, calomelano saturado.....**136**

Figura III.16. Voltamograma Cíclico do pirrol 0,01 mol L⁻¹ em meio de acetonitrila e perclorato de lítio 0,1 mol L⁻¹, utilizando eletrodo de aço inox 316 com velocidade de varredura de 10mV em 100 ciclos. Condições eletroquímicas: eletrodo de trabalho, aço inox 316; contra-eletrodo, fio de platina espiralado; eletrodo de referência, calomelano saturado.**137**

Figura III.17. Eficiência da fase extratora de PPY eletropolimerizada em meio de perclorato de lítio com diferentes números de ciclos, frente ao processo SPME. Condições de extração SPME: amostra de 1mL de plasma enriquecido com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹, 4 mL de solução borato 0,05 mol L⁻¹pH 9,0, agitação de 1100 rpm por 40 minutos a 50°C. Dessorção em 3 mL de acetonitrila a 50°C por 20 minutos.....**138**

Figura III.18. Eficiência da fibra de PPY eletropolimerizada em meio de perclorato de tetrabutilamônio com diferentes números de ciclos, frente ao processo SPME. Condições de extração SPME: amostra de 1mL de água enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹, 4 mL de solução borato 0,05 mol L⁻¹pH 9,0, agitação de 1100 rpm por 40 minutos a 50°C. Dessorção em 3 mL de acetonitrila a 50°C por 20 minutos.....**139**

Figura III.19. Microscopia eletrônica de varredura da fibra de PPY eletropolimerizada em meio eletrolítico de perclorato de lítio em acetonitrila. Condições eletrodeposição: eletrodo de trabalho, fio de aço

inox 316; contra - eletrodo, fio de platina espiralado; eletrodo de referência, calomelano saturado; velocidade de varredura 10 mV s⁻¹ em 100 ciclos.141

Figura III.20. Microscopia eletrônica de varredura da fibra de PPY eletropolimerizada em meio eletrolítico de perclorato de tetrabutylamônio em acetonitrila. Condições eletrodeposição: eletrodo de trabalho, fio de aço inox 316; contra - eletrodo, fio de platina espiralado; eletrodo de referência, calomelano saturado; velocidade de varredura 10 mV s⁻¹ em 100 ciclos.142

Figura III.21. Voltamogramas cíclico obtidos para a eletrodeposição do PPY em meio eletrolítico de perclorato de lítio (LiClO₄) (0,1 mol L⁻¹) e em meio de perclorato de tetrabutylamônio (PTBA) (0,1 mol L⁻¹). Condições eletrodeposição: eletrodo de trabalho, fio de aço inox 316; contra - eletrodo, fio de platina espiralado; eletrodo de referência, calomelano saturado; velocidade de varredura 10 mV s⁻¹ em 1 ciclo; potencial de varredura de 0 a 1,2 V.143

Figura III.22. Microscopia eletrônica de varredura da fibra de PPY, eletrodepositada em perclorato de lítio em acetonitrila, após 30 extrações. Condições eletrodeposição: eletrodo de trabalho, fio de aço inox 316; contra - eletrodo, fio de platina espiralado; eletrodo de referência, calomelano saturado; velocidade de varredura 10 mV s⁻¹ em 100 ciclos.144

Figura III.23. Influência do pH da matriz no processo SPME – PPY. Condições de extração: agitação (1100 rpm), temperatura 50°C, por 45 minutos. Condições de extração: 1,0 mL de amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹ e diluída em 4,0 mL de solução tampão em diferentes valores de pH (borato 0,05 mol L⁻¹, pH 9,00 e pH 11, fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 4,0 e pH 7,0), durante 45 minutos a temperatura 50°C, sob agitação (1100 rpm). O processo de dessorção foi realizado sob agitação em 3 mL de acetonitrila por 15 minutos a 50°C.148

Figura III.24. Cromatograma obtido após análise SPME – PPY /LC empregando a fase extratora de PPY eletrodepositado em meio eletrolítico de perclorato de lítio e acetonitrila. FEN- fenacetina, MOC- moclobemida; MIR- mirtazapina; CIT- citalopram; PAR- paroxetina; DUL- duloxetina; FLU- fluoxetina; SER- sertralina e CLO-clomipramina. Condições SPME: 1,0 mL de amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹ e diluída em 4,0 mL de solução borato, pH 9,00, 0,05 mol L⁻¹, durante 45 minutos a temperatura 50°C, sob agitação (1100 rpm). O processo de dessorção foi realizado sob agitação em 3 mL de acetonitrila por 15 minutos a 50°C. O extrato foi seco e ressuspendido em 200µL de fase móvel dos quais 50 µL foram injetados no sistema cromatográfico LC. Condições cromatográficas: fase móvel empregada: tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 3,8 e acetonitrila nas proporções (57: 43, v/v), coluna C18 Lichrospher RP-select B e detector UV-vis ($\lambda = 230$ nm).....**146**

Figura III.25. Otimização dos tempos de extração a 20°C para os fármacos: fenacetina (FEN), moclobemida (MOC), mirtazapina (MIR), citalopram (CIT), paroxetina (PAR), duloxetina (DUL), fluoxetina (FLU) e sertralina (SER). Condições de extração: 1,0 mL de amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹ e diluída em 4,0 mL de solução tampão fosfato, pH 7,00, 0,05 mol L⁻¹, a temperatura 20°C em diferentes tempos, sob agitação (1100 rpm). O processo de dessorção foi realizado sob agitação em 3 mL de acetonitrila por 15 minutos a 50°C.**149**

Figura III.26. Otimização dos tempos de extração a 40°C para os fármacos: fenacetina (FEN), moclobemida (MOC), mirtazapina (MIR), citalopram (CIT), paroxetina (PAR), duloxetina (DUL), fluoxetina (FLU) e sertralina (SER). Condições de extração: 1,0 mL de amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹ e diluída em 4,0 mL de solução tampão fosfato, pH 7,00, 0,05 mol L⁻¹, a temperatura 40°C em diferentes tempos, sob agitação (1100 rpm). O

processo de dessorção foi realizado sob agitação em 3 mL de acetonitrila por 15 minutos a 50°C.150

Figura III.27. Otimização dos tempos de extração a 50°C para os fármacos: fenacetina (FEN), moclobemida (MOC), mirtazapina (MIR), citalopram (CIT), paroxetina (PAR), duloxetina (DUL), fluoxetina (FLU) e sertralina (SER). Condições de extração: 1,0 mL de amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹ e diluída em 4,0 mL de solução tampão fosfato, pH 7,00, 0,05 mol L⁻¹, a temperatura 50°C em diferentes tempos, sob agitação (1100 rpm). O processo de dessorção foi realizado sob agitação em 3 mL de acetonitrila por 15 minutos a 50°C.150

Figura III.28. Otimização dos tempos de extração a 60°C para os fármacos: fenacetina (FEN), moclobemida (MOC), mirtazapina (MIR), citalopram (CIT), paroxetina (PAR), duloxetina (DUL), fluoxetina (FLU) e sertralina (SER). Condições de extração: 1,0 mL de amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹ e diluída em 4,0 mL de solução tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 7,00, a temperatura 60°C em diferentes tempos, sob agitação (1100 rpm). O processo de dessorção foi realizado sob agitação em 3 mL de acetonitrila por 15 minutos a 50°C.151

Figura III.29. Otimização dos tempos de extração a 25°C para os antidepressivos. Condições SPME: 1,0 mL de amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹ e diluída em 4,0 mL de solução tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0, a temperatura 25°C em diferentes tempos sob agitação (1100 rpm). O processo de dessorção foi realizado sob agitação em 3 mL de acetonitrila por 15 minutos a 25°C.152

Figura III.30. Processo SPME-PPY/LC-UV para a duloxetina (300 ng mL⁻¹) em análise simultânea e individual a 25°C. Condições SPME: 1,0 mL de amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos (análise simultânea) na concentração de 500 ng mL⁻¹, já para a análise

individual utilizou-se 1,0 mL de amostra de plasma enriquecida somente com duloxetine (300 ng mL^{-1}), ambas diluídas em 4,0 mL de solução tampão fosfato, pH 7,00, $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, a temperatura 25°C em diferentes tempos de extração sob agitação (1100 rpm). O processo de dessorção foi realizado sob agitação em 250 μL de fase móvel por 15 minutos a 25°C . 50 μL do extrato foi injetado no sistema cromatográfico. Condições cromatográficas: fase móvel empregada: tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,8 e acetonitrila nas proporções (57: 43, v/v), coluna C18 Lichrospher RP-select B e detector UV-vis ($\lambda = 230 \text{ nm}$).**154**

Figura III.31. Avaliação do tempo de dessorção para os antidepressivos. Condições de extração: 1,0 mL de amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL^{-1} e diluída em 4,0 mL de solução tampão fosfato, pH 7,00, $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, a temperatura 25°C , durante 40 minutos sob agitação (1100 rpm). O processo de dessorção foi realizado em 250 μL de fase móvel, a 25°C em diferentes tempos. 50 μL do extrato foram injetados no sistema cromatográfico. Condições cromatográficas: fase móvel empregada: tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,8 e acetonitrila nas proporções (57: 43, v/v), coluna C18 Lichrospher RP-select B e detector UV-vis ($\lambda = 230 \text{ nm}$).**156**

Figura III.32. Influência do volume de amostra de plasma no processo SPME-PPY/LC-UV. Condições de SPME: amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL^{-1} e diluída em 4,0 mL de solução tampão fosfato, pH 7,00, $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, a temperatura 25°C , durante 40 minutos sob agitação (1100 rpm). O processo de dessorção foi realizado em 250 μL de fase móvel, a 25°C durante 15 minutos. 50 μL do extrato foram injetados no sistema cromatográfico. Condições cromatográficas: fase móvel empregada: tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,8 e acetonitrila nas proporções (57: 43, v/v), coluna C18 Lichrospher RP-select B e detector UV-vis ($\lambda = 230 \text{ nm}$).**157**

Figura III.33. Cromatograma obtido após extração SPME-PPY/LC-UV do plasma branco de referência. Condições cromatográficas: fase móvel

empregada: tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 3,8 e acetonitrila nas proporções (57: 43, v/v), coluna C18 Lichrospher RP-select B e detector UV-vis (λ = 230 nm).**160**

Figura III.34. Cromatograma obtido após extração SPME–PPY/LC-UV dos antidepressivos: mirtazapina, citalopram, paroxetina, duloxetine, fluoxetina e sertralina na concentração de 300 ng mL⁻¹. Condições cromatográficas: fase móvel empregada: tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 3,8 e acetonitrila nas proporções (57: 43, v/v), coluna C18 Lichrospher RP-select B e detector UV-vis (λ = 230 nm). **..161**

Figura III.35. Cromatograma obtido após análise SPME–PPY/LC-UV dos antidepressivos: mirtazapina, citalopram, paroxetina, duloxetine, fluoxetina e sertralina na concentração referentes ao limite de quantificação dos antidepressivos. Condições cromatográficas: fase móvel empregada: tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 3,8 e acetonitrila nas proporções (57: 43, v/v), coluna C18 Lichrospher RP-select B e detector UV-vis (λ = 230 nm).**164**

Figura III.36 A. Análise SPME–PPY/LC-UV de amostra de plasma de paciente em terapia com antidepressivo mirtazapina, concentração plasmática determinada: 28,79 ng mL⁻¹. Condições cromatográficas: fase móvel empregada: tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 3,8 e acetonitrila nas proporções (57: 43, v/v), coluna C18 Lichrospher RP-select B e detector UV-vis (λ = 230 nm).**168**

Figura III.36 B. Análise SPME–PPY/LC-UV de amostras de plasmas de pacientes em terapia com antidepressivo duloxetine, concentração plasmática determinada: 89,50 ng mL⁻¹ . Condições cromatográficas: fase móvel empregada: tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 3,8 e acetonitrila nas proporções (57: 43, v/v), coluna C18 Lichrospher RP-select B e detector UV-vis (λ = 230 nm).**169**

Figura III.36 C. Análise SPME–PPY/LC-UV de amostras de plasmas de pacientes em terapia com antidepressivo citalopram, concentração plasmática determinada: 61,25 ng mL⁻¹ . Condições cromatográficas: fase

móvel empregada: tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 3,8 e acetonitrila nas proporções (57: 43, v/v), coluna C18 Lichrospher RP-select B e detector UV-vis (λ = 230 nm).**170**

LISTA DE TABELAS

Tabela I.1. Propriedades dos antidepressivos.....	15
Tabela I.2. Métodos convencionais empregados às análises de antidepressivos.....	19
Tabela II.1. Aplicações da técnica SBSE para análise em fluídos biológicos.....	47
Tabela II.2. Composição das fases móveis avaliadas.....	53
Tabela II.3. Fator de retenção (k) para as diferentes fases móveis avaliadas.....	62
Tabela II.4. Resolução cromatográfica (R) para as diferentes fases móveis avaliadas.....	63
Tabela II.5. Ordem de eluição dos antidepressivos e seus respectivos tempos de retenção.....	64
Tabela II.6. Tempo de retenção dos fármacos avaliados como possíveis interferentes.....	83
Tabela II.7. Linearidade e limite de quantificação do método SBSE/LC-UV desenvolvido.....	84
Tabela II. 8. Precisão inter ensaios, exatidão e recuperação absoluta do método SBSE/LC-UV.....	86
Tabela III.1. Alguns trabalhos da literatura utilizando o método SPME/LC para análise de fármacos.....	110
Tabela III.2. Tempo de retenção dos fármacos estudados como possíveis interferentes.....	162
Tabela III.3. Linearidade, limite de quantificação (LOQ) e coeficiente de variação (C. V.) do método SPME-PPY/LC-UV para análise simultânea.....	163
Tabela III.4. Recuperação, exatidão e precisão inter-ensaio nas concentrações de LOQ e 200 ng mL ⁻¹	166

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADS - Alquil-Diol-Sílica.

ADTS - Antidepressivos Tricíclicos.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

CIT – Citalopram.

CG – Cromatografia Gasosa.

CLO – Clomipramina.

CV - Voltametria Cíclica.

C.V. – Coeficiente de Variação.

CW - Carbowax

DAD – Arranjo de diodo.

DUL – Duloxetina.

DVB – Divinilbenzeno.

ESI - Ionização por Eletro-Spray.

FEN – Fenacetina.

FD - Detector de Fluorescência.

FLU – Fluoxetina.

LC - Cromatografia Líquida.

LOD - Dessorção Líquida.

LLE - Extração Líquido – Líquido.

LOQ - Limite de Quantificação

H1 – Receptor histaminico.

HD – Derivatização em Fase Gasosa.

MAOS - Inibidores da Monoamino Oxidase.

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura.

MIR – Mirtazapina.

MS - espectrômetro de massas.

MOC - Moclobemida.

NaSSa - Receptores Noradrenérgico e Serotonérgico.

PAR – Paroxetina.

PDMS - Polidimetilsiloxano.

PPPY - Poli-N-fenilpirrol.

PPY – Poli(pirrol).

PTBA – Perclorato de tetrabutylamônio.

RIMA - Inibidores Reversíveis da Monoamino Oxidase A.

SBSE – Extração sortiva em barra de agitação.

SER – Sertralina.

SNRIs - Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina.

SPE - Extração em Fase Sólida.

SPME – Microextração em fase sólida.

SSRIs – Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina.

TD – Dessorção térmica.

UV- Detector UV-vis.

5-HT_{2c} - Neurotransmissor Monoamino Serotonina 2c,

5-HT - Neurotransmissores Monoamina Serotonina

RESUMO

A depressão em idosos é uma desordem persistente e recorrente, resultado do stress psicossocial ou efeito de doenças fisiológicas, que podem acarretar a desabilidade do indivíduo, aumento dos sintomas das doenças clínicas, na maior utilização dos serviços de saúde e altas taxas de suicídios.

A monitorização terapêutica permite a individualização do regime de dosagem, assegurando a eficácia clínica e minimizando os efeitos adversos dos fármacos, prescritos na clínica. Os antidepressivos têm sido monitorados, pois, 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.

Os antidepressivos tricíclicos (**ADTs**): imipramina, amitriptilina, nortriptilina e desipramina, embora eficazes e ainda muito utilizados, apresentam efeitos adversos, não desejáveis. Os antidepressivos, inibidores seletivos da recaptação de serotonina (**SSRIs**): citalopram, fluoxetina, paroxetina e sertralina, apresentam eficácia clínica comparável aos clássicos **ADTs**, mas destituídos dos efeitos adversos associados aos mesmos.

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

A microextração em fase sólida tem sido empregada em diferentes análises em fluidos biológicos, porém essa técnica apresenta certas limitações como, o número limitado de fases extratoras disponíveis no comércio que sejam adequadas para a análise de compostos não iônicos.

A avaliação de novas fases extratoras, mais seletivas, estáveis e de baixo custo tem sido requerida para a análise de fármacos. O interesse no uso de poli(pirrol) (PPY), como fase extratora para SPME, está relacionado às diferentes interações dos fármacos (hidrofóbicas, π - π , com o grupo funcional polar, troca iônica, ácido-base) aos grupos multifuncionais deste polímero. Sua polimerização pode ser alcançada tanto por oxidação química, quanto por eletrodeposição em meio aquoso ou orgânico. O método eletroquímico apresenta algumas vantagens, tais como: o polímero ou mistura de polímeros podem ser revestidos diretamente em um metal, incorporação de diferentes grupos funcionais, entre outras, a polimerização pode ser eletroquimicamente controlada através da voltametria cíclica.

Neste trabalho o poli(pirrol) (**PPY**) foi eletrodepositado em eletrodo de aço inox e empregado para a microextração em fase sólida dos antidepressivos: paroxetina, fluoxetina, mirtazapina, duloxetina, sertralina e citalopram. As variáveis da eletrodeposição, número de ciclos e contra-íon empregado no processo de eletrodeposição foram otimizadas. Assim como as variáveis SPME: tempo, temperatura, pH e volume de amostra, e tempo e solvente de dessorção; almejando maior sensibilidade para o método **SPME-PPY/LC-UV** proposto.

A extração sortiva em barra de agitação (**SBSE**), técnica recente de preparo de amostras, para a pré-concentração de compostos orgânicos presentes em amostras biológicas, baseia-se na extração estática, através do polímero polidimetilsiloxano (**PDMS**), no qual ocorre a dissolução (sorção) do analito.

Neste trabalho, as técnicas SBSE e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV (**SBSE/LC-UV**) foram avaliadas para a análise simultânea de antidepressivos em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica. As condições cromatográficas de análise, assim

como as variáveis SBSE de extração (tempo, temperatura, força iônica, pH da matriz) e tempo de dessorção, foram otimizadas, visando adequada sensibilidade analítica.

A validação analítica foi realizada segundo normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (**ANVISA**), para ambos os métodos propostos, em diferentes concentrações plasmáticas, as quais contemplam o intervalo terapêutico.

Segundo os parâmetros de validação avaliados, os métodos **SBSE/LC-UV** e **SPME-PPY/LC-UV** padronizados poderão ser empregados nas análises dos antidepressivos, para fins de monitorização terapêutica.

Palavras-chave: Microextração em fase sólida. Poli(pirrol). Extração sortiva em barra de agitação. Cromatografia líquida de alta eficiência. Antidepressivos. Plasma.

SUMMARY

Depression in the elderly is a persistent and recurrent disorder resulting from psychosocial stress or physiological effect or disease. This condition can lead to disability, cognitive impairment, enhanced symptoms of medical illnesses, increased use of health care services and, increased of suicide rates.

Therapeutic monitoring allows individualization of the dose regimen, ensuring clinical effectiveness and minimizing the adverse effects of drugs, prescribed at the clinic. Antidepressants have been monitored because they present well - established therapeutic intervals; in other words, most of the patients present plasmatic concentrations within this fixed range, so that their psychiatric disorders are kept under control and the adverse effects are acceptable.

However the tricyclic antidepressants **(ADTs)** imipramine, amitriptyline, nortryptiline, and desipramine have adverse effects they are usually used. The selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) antidepressants citalopram, fluoxetine, paroxetine, and sertraline, are clinically effectiveness as the classic ADTs, but they do not lead to the adverse effects associated to the ADTs.

The conventional methods employed in the treatment of biological samples for analysis of antidepressants by chromatographic techniques have been the liquid-liquid extraction **(LLE)**, and solid phase extraction **(SPE)** techniques.

Solid-phase microextraction **(SPME)** has been used in various analyses of biological fluids. However, this technique has limitations such as, the small number of extracting phases commercially available that are appropriate for the analysis of non-ionic compounds.

Investigation of new extraction phases that are more selective and stable, as well as inexpensive, has been requested for drug analysis. The interest in the use of poly(pyrrole) (**PPY**) as an extraction phase for SPME is related to the different interactions of the drugs (hydrophobic, π - π , with the polar functional group, ionic exchange and acid-base) with the multifunctional groups on this polymer. The PPY polymerization can be achieved by chemical oxidation or electropolymerization in aqueous solution or organic solvents. The electrochemical method has advantages such as, the polymer or a mixtures of polymers can be directly deposited on a metal wire, different functional groups can be incorporated, polymerization can be electrochemically controlled by cyclic voltammetry.

In this work poly(pyrrole) was electropolymerized on stainless steel electrodes, and employed for the solid phase microextraction of the antidepressants paroxetine, fluoxetine, mirtazapine, duloxetine, sertraline, and citalopram. The electropolymerization variables, the number of cycles and counterion employed in the process were optimized, as well as the SPME variables, time, temperature, pH, sample volume, and desorption solvent; aiming at a better sensibility for the proposed method **SPME-PPY/LC-UV**.

The stir bar sorptive extraction (**SBSE**), recently established technique for samples preparation, that targets the pre concentration of organic compounds present in biological samples. It is based on static extraction, through the polymeric polydimethylsiloxane (**PDMS**), where there is analyte dissolution (sorption).

In this work, the SBSE technique and liquid chromatography with UV detector (**SBSE/LC-UV**) were evaluated for the simultaneous determination of antidepressants in plasma samples for therapeutic monitoring purposes. The chromatographic conditions, the SBSE extraction

variables (time, temperature, ionic strength and matrix pH), and the desorption time were optimized for appropriate analytical sensibility.

The analytical validation was accomplished according to the norms of National Health Surveillance Agency (**ANVISA**) for both of the proposed methods, in different plasmatic concentrations, which contemplate the therapeutic interval.

According to the evaluated validation parameters, the standardized methods **SBSE/LC-UV** and **SPME-PPY/LC-UV** can be used in the analyses of antidepressants for therapeutic drug monitoring purposes.

Key Words: Solid-phase microextraction, poly(pyrrole), stir bar sorptive extraction, liquid chromatography, antidepressants, plasma sample.

CAPITULO I

I.1 INTRODUÇÃO

I.1.1 Depressão

A depressão, síndrome clínica que afeta pensamentos, humor, sentimentos, comportamento e saúde física, tem sido denominada como o mal do século. Esta síndrome foi relatada desde a Grécia antiga, pelo nome de melancolia e mais tarde na Europa ocidental como acedia. No ocidente Hipócrates foi o primeiro a relatar as características da depressão no século 4 a. C.¹.

Embora conhecida desde a Grécia antiga, a depressão só foi considerada uma desordem psiquiátrica a partir do século 18 com os estudos dos chamados alienistas, médicos que consideravam a melancolia como um tipo de loucura ou mania. Atualmente a depressão é considerada um distúrbio psiquiátrico complexo sendo subdividida em classes, de acordo com os sintomas que o paciente apresenta. Os principais sintomas atribuídos à pacientes depressivos tem sido apatia, insônia, desânimo, variações de humor, ansiedade, agitação, dentre outros.

No Quadro I.1 pode-se observar as diferentes caracterizações da depressão segundo os principais sintomas ².

A depressão é uma das desordens psiquiátricas mais freqüentes, afeta aproximadamente 17% da população nos dias de hoje, sendo a maior causa da incapacitação da população mundial, atingindo todas as faixas etárias desde crianças a idosos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a depressão será principal causa da inaptidão e morte prematura da população mundial até em 2020 ³.

A terapia e as conseqüências, diretamente ou indiretamente associadas à depressão, resultam em alto custo à economia mundial. Na Europa, no ano de 2004 gastos indiretos com a depressão, devido à morbidade e à mortalidade foi estimado em 76 bilhões de Euros ³.

Quadro I.1. Tipos de depressão ².

Segundo a literatura ^{2 - 4} pacientes com duas ou mais doenças fisiológicas crônicas apresentam sintomas da depressão. Em alguns casos, a depressão tem origem em outros efeitos fisiopatológicos, como por exemplo, doenças cerebrovasculares, em geral associada a dores, stress, ou outros sintomas físicos. A presença de comorbidade médica influencia, significativamente, o diagnóstico da depressão. Os médicos, em geral,

tendem, erroneamente a acreditar que as causas patológicas sejam justificativas para os sintomas depressivos nestes pacientes.

A depressão tem sido sub-diagnosticada e sub-tratada. De 50% a 60% dos casos de depressão não têm sido diagnosticados pelo clínico ⁵. Muitas vezes, os pacientes não recebem tratamento suficientemente adequado e/ou 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, que reconhecem apenas os sintomas físicos e classificam os sintomas da depressão como “compreensível” e aceitável. No entanto, 70% da morbi-mortalidade associada à depressão pode ser prevenida com tratamento adequado ⁵⁻⁶.

A depressão é uma síndrome clínica muito comum e de longa duração, porém tratável. O desenvolvimento de fármacos específicos para o tratamento da depressão é relatado desde os anos de 1950, com a descoberta dos inibidores da monoamina oxidase e dos antidepressivos tricíclicos ⁷.

I.1.2 Depressão em Idosos

A população mundial de idosos cresceu significativamente desde 1950. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2010, 7,3% da população mundial terá mais de 65 anos, e em 2030 esse número deverá ser superior a 20% ⁸.

A depressão em idosos é uma desordem persistente e recorrente, resultado do stress psicossocial ou efeito de doenças fisiológicas, que podem acarretar a desabilidade do indivíduo, aumento dos sintomas das

doenças clínicas, na maior utilização dos serviços de saúde e altas taxas de suicídios. Dessa forma, os médicos tendem a considerar a depressão como um sintoma comum decorrente da idade, pois os sintomas da depressão nesta faixa etária são facilmente mascarados por complicações somáticas ou por sintomas cognitivos normalmente chamados de “depressão mascarada” e “pseudodemência”. Atinge de 22 a 46 % dos idosos dependendo do grupo de população analisada ⁹.

Os idosos, em geral, apresentam maior propensão ao suicídio, dessa forma, a depressão nessa fase da vida deve ser muito bem monitorada. Ainda assim, existem poucas publicações e estudos clínicos relacionados com a depressão em idosos ^{8 - 14}.

A depressão quando diagnosticada e tratada adequadamente, pode-se ter significativa melhora na qualidade de vida. A farmacoterapia é fundamental para idosos depressivos, pois com a idade podem ocorrer mudanças fisiológicas, doenças e administração concomitante de outros fármacos, o que pode alterar o metabolismo dos antidepressivos ¹¹.

Os pacientes idosos têm apresentado baixa aderência ao tratamento da depressão, decorrente dos distúrbios cognitivos e aos efeitos adversos. De fato, mudanças na farmacocinética e na farmacodinâmica, relacionadas com a idade, podem acentuar os efeitos adversos dos antidepressivos ⁸.

Em indivíduos idosos ocorre a redução da proporção de gordura corporal, aumentando a concentração de fármacos lipofílicos no plasma, e conseqüentemente indivíduos de baixo peso recebem altas doses por unidade de massa corporal. Portanto, o baixo peso associado a idade avançada constituem um fator de risco para que ocorra overdose na terapia com os antidepressivos ¹⁰.

I.1.3 Antidepressivos

O uso de fármacos no tratamento de desordens psiquiátricas tem uma história relativamente curta, e ainda encontra-se em crescente fase de desenvolvimento. Em muitas áreas da psiquiatria, os avanços da ciência têm seguido um curso fortuito. Novos medicamentos desenvolvidos têm apresentado mudanças benéficas na qualidade de vida dos pacientes. Uma vez que a farmacologia desses medicamentos é totalmente elucidada, novos agentes são desenvolvidos com ações mais específicas com base no sistema de neurotransmissão fazendo com que esses fármacos sejam bem tolerados ^{3, 15-17}.

O desenvolvimento de fármacos, como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (**SSRIs**), coincide com o aumento na prescrição de antidepressivos; em razão do aumento do diagnóstico ¹⁴. Os psiquiatras atualmente têm uma ampla gama de medicamentos que podem ser prescritos, dependendo das necessidades individuais de cada paciente, porém todos os antidepressivos existentes, têm seu fundamento baseado na teoria monoamino da depressão, a qual atribui a deficiência biológica da monoamina à causa da depressão ¹⁵.

Recentemente, uma nova geração de antidepressivos tem substituído os antidepressivos tricíclicos e os inibidores da monoaminoxidase, por razões de segurança e tolerabilidade, além de aumentar a eficácia. Cada mecanismo de atuação confere classes distintas aos antidepressivos embora os mecanismos da depressão ainda não tenham sido totalmente estabelecidos. Os antidepressivos atualmente disponíveis atuam aumentando a atividade dos neurotransmissores por inibição da recaptação, ou inibição enzimática, ou na atividade dos receptores pré ou pós- sinápticos ¹⁵⁻¹⁸.

I.1.3.1 Antidepressivos Tricíclicos (ADTs)

Este grupo heterogêneo contém os inibidores da recaptação mais antigos. Esses apresentam estruturas similares aos antipsicóticos, como as clorpromazinas, e compartilham de uma ampla gama de ações farmacológicas. Além da inibição da recaptação de serotonina, os antidepressivos tricíclicos também antagonizam o sinal pós-sináptico dos $\alpha 1$ -adrenoreceptores, dos receptores histamínicos (**H1**), dos receptores muscarínicos colinérgicos e dos neurotransmissores monoamina serotonina (**5-HT**). Essas ações são responsáveis por uma série de efeitos indesejáveis e tóxicos, quando comparados a fármacos mais seletivos, como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina ¹⁵.

Os antidepressivos tricíclicos ainda são freqüentemente prescritos por possuírem um espectro clínico amplo e boa eficácia, a qual até o momento não foi excedida por novos fármacos. Porém, sua eficácia tem sido observada com doses equivalentes a 150 mg/dia e sua baixa tolerabilidade pode acarretar pouca ou nenhuma aderência ao tratamento, ou prescrições de doses sub-terapêuticas. Alguns países relataram uma redução nas taxas de suicídio, desde que a prescrição dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina superou a dos antidepressivos tricíclicos ¹⁹.

Em doses elevadas, os antidepressivos tricíclicos apresentam forte ação anticolinérgica que pode retardar o trânsito gastrointestinal e ampliar o tempo de esvaziamento gástrico, resultando na absorção mais lenta ou variável do fármaco e complicando o tratamento de overdoses agudas. As concentrações séricas atingem seus níveis máximos após algumas horas de ingestão, variando de 100 a 500 ng/mL⁻¹ com meia vida de eliminação que varia de 12 a 30 horas para o fármaco e de 30 a 70 horas para o seu metabólito ativo ²⁰.

Os fármacos, imipramina, amitriptilina, nortriptilina, clomipramina e desipramina são representantes dos antidepressivos tricíclicos cujas estruturas encontram-se ilustradas na Figura I.1.

Figura I.1. Representação estrutural dos antidepressivos tricíclicos.

Os antidepressivos tricíclicos exibem os efeitos adversos mais intensos e freqüentes, quando comparados aos antidepressivos não-tricíclicos. A redução de acetilcolina em pacientes idosos torna-os mais suscetíveis aos efeitos adversos, dos antidepressivos tricíclicos **(ADTs)**¹⁰⁻¹². O mecanismo de atuação desses antidepressivos pode resultar em diversos efeitos adversos, os quais não só reduzem a aderência do paciente ao tratamento, mas também acarretam doenças e comorbidade em pacientes idosos ⁸.

I.1.3.2 Inibidores Enzimáticos

Esses fármacos apresentam mecanismo alternativo por aumentar a disponibilidade de serotonina, noradrenalina e dopamina sináptica. O mecanismo de ação dos neurotransmissores dentro da terminação pré-sináptica é inibido por antagonistas das enzimas monoamino oxidase. A eficácia desses antidepressivos é semelhante a dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina **(SSRIs)**, mas apresenta efeitos adversos diferentes como náusea, tontura e ganho de peso ⁸.

I.1.3.3.a Inibidores da Monoamino Oxidase (MAOs)

Os MAOs ligam se irreversivelmente às enzimas da monoamino oxidase, cuja atividade metabólica será restaurada somente pela síntese de novas enzimas, após algumas semanas. Essas enzimas estão localizadas nas membranas mitocondriais e encontram-se amplamente distribuídas por todo o corpo nas terminações nervosas, no fígado, na mucosa intestinal, nas plaquetas e em outros órgãos ²⁰. O uso clínico dos MAOS tem sido limitado devido ao número de efeitos adversos e toxicidade em overdose. Dentre esses efeitos adversos pode-se ressaltar a ocorrência

de crises de hipertensão, as quais tem sido associada à ingestão de alimentos contendo tiramina, ou medicamentos com propriedades simpatomiméticas ¹⁷.

I.1.3.3.b Inibidores reversíveis da monoamino oxidase A (RIMA)

A moclobemida é uma MAO do tipo benzamida (Figura I.2) que liga-se competitivamente à enzima e, assim, pode ser deslocada pelos substratos de neurotransmissores. Esse fármaco tem sido seletivo para a enzima monoamino oxidase-A, o que tem reduzido as reações de hipertensão, embora dietas de precaução devam ser adotadas para doses diárias acima de 900 mg/dia. Nessa dose o antidepressivo torna-se menos seletivo ²¹. Embora bem seguro e de alta tolerabilidade, a moclobemida não é eficiente no tratamento de depressão maior ¹⁵. A moclobemida não apresenta intervalo terapêutico bem estabelecido.

Figura I.2. Representação estrutural da moclobemida.

I.1.3.4 Inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRIs)

Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina têm sido considerados os primeiros antidepressivos altamente seletivos para o neurotransmissor monoamino serotonina (**5-HT**)¹⁵⁻²¹.

Esses antidepressivos são efetivos na maioria das desordens de humor e ansiedade e o seu uso geralmente substituiu o uso dos antidepressivos tricíclicos, devido à maior tolerabilidade e segurança. Entretanto, esses não são desprovidos de efeitos adversos; por exemplo, a fluoxetina, representante dessa classe, tem atividade de antagonista ao neurotransmissor monoamino serotonina 2c (**5-HT_{2c}**), podendo causar dor de cabeça, agitação e perda de apetite^{15-17, 22}.

Os **SSRIs** podem interagir com outros fármacos em especial com os inibidores da monoamino oxidase, que pode resultar na letal síndrome serotônica, ou apresentar os seguintes efeitos adversos: inquietude, irritabilidade, tremor, sudorese e hiper-reflexia¹⁵.

A fluoxetina, sertralina, citalopram e paroxetina são representantes dessa classe de antidepressivos, cujas estruturas encontram-se ilustradas na Figura I.3.

Os **SSRIs** são rapidamente absorvidos, ligam-se às proteínas plasmáticas (alta porcentagem), todos deslocam outros fármacos da ligação proteica, aumentando seu nível plasmático. Metabolizados primariamente pelo fígado, todos os SSRIs afetam as enzimas metabolizadoras do citocromo P-450 (em menor proporção, a sertralina) e podem comprometer o metabolismo de outros fármacos metabolizados por esse sistema^{15, 16, 19 - 25}. As concentrações plasmáticas de sertralina e

citalopram são proporcionais às doses administradas (farmacocinética linear), o que não ocorre com fluoxetina e paroxetina.

As concentrações plasmáticas terapêuticas recomendadas têm sido de 100 a 500 ng mL⁻¹ para fluoxetina, de 25 a 50 ng mL⁻¹ para a sertralina, de 30 a 100 ng mL⁻¹ para a paroxetina e de 75 a 150 ng mL⁻¹ para o citalopram ²⁰. No entanto, esses intervalos terapêuticos não se encontram claramente definidos, e muitos estudos com os SSRIs mostram que as concentrações plasmáticas variam de 50 a 200 ng mL⁻¹ ²¹.

Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (**SSRIs**) têm sido a opção inicial para tratamento de depressão em idosos, pois não apresentam efeitos anticolinérgicos, anti-adrenérgico, antihistaminérgico e efeitos cardiotóxicos, quando comparados aos antidepressivos tricíclicos. Os possíveis efeitos adversos desses antidepressivos podem ficar limitados à primeira semana de tratamento, porém são mais acentuados em idosos que em indivíduos jovens. Um efeito adverso normalmente relacionado ao tratamento com inibidores seletivos da recaptação de serotonina em idosos é a redução da concentração de sódio no sangue, possivelmente devido à excreção inapropriada de hormônios antidiuréticos ^{8, 10}.

Figura I.3. Representação estrutural de alguns antidepressivos SSRIs.

I.1.3.5 Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina (SNRIs)

Após o desenvolvimento dos SSRIs surgiu uma classe de fármacos com atividade inibitória adicional, nos sítios de recaptação de noradrenalina, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (**SNRIs**). Os SNRIs podem apresentar afinidades diferentes pelos transportadores de serotonina e noradrenalina ¹⁵. Em baixas doses,

venlafaxina, representante dessa classe de antidepressivos, tem predominantemente efeitos serotoninérgicos.

A duloxetina, outro representante dessa classe de antidepressivos (Figura I.4), tem apresentado efeitos serotoninérgicos e noradrenérgicos mais equilibrados. A tolerabilidade é semelhante a dos SSRIs, embora em doses altas, tem sido necessário o monitoramento da pressão sanguínea ²⁶. Provavelmente o duplo mecanismo de ação confere ao antidepressivo maior eficácia.

Há evidências que os inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina apresentam maior eficácia no tratamento da depressão, quando comparados aos SSRIs para grupos de pacientes que apresentam depressão crônica ¹⁴⁻¹⁵. As concentrações administradas comumente para a duloxetina variam de 40 a 60 mg/ dia, porém o seu intervalo terapêutico ainda não foi bem estabelecido ²⁶.

Figura I.4. Representação estrutural da duloxetina.

I.1.3.6 Receptores Noradrenérgico e Serotonérgico (NaSSa)

Esses fármacos compartilham a propriedade de bloqueio inibitório pré-sináptico dos α_2 -adrenoceptores, resultando em aumento do sinal sináptico, liberando serotonina e noradrenalina, como também agindo em vários receptores de pós-sinápticos, inclusive o neurotransmissor monoamino serotonina. Os antidepressivos dessa classe tendem a ter efeito calmante ¹⁵.

A mirtazapina (Figura I.5) é um antidepressivo noradrenérgico e serotonérgico seletivo (**NaSSA**). Atua aumentando a liberação sináptica da serotonina e noradrenalina, via bloqueio dos inibidores pré-sinápticos ^{15, 27-29}.

Figura I.5. Representação estrutural da mirtazapina.

As diferentes classes dos antidepressivos e os efeitos adversos que esses podem causar encontram-se descritos na Tabela I.1, assim como, o

risco de descontinuidade no tratamento da depressão com a administração desses.

Tabela I.1. Propriedades dos antidepressivos.

Classe de antidepressivo	Agente antidepressivo	Outros usos clínicos	Efeito adverso	Descontinuidade
TCAs	Amitriptilina	Transtorno obsessivo – compulsivo, síndrome do pânico, neuralgia, enuresis noturna	Efeito anticolinérgico e antihistamínico, disfunção sexual e postural e hipotensão	Altamente relatada
	Amoxapina			
	Clomipramina			
	Doxepina			
	Imipramina			
	Maprotilina			
	Nortriptilina			
	Trimipramina			
SSRI	Citalopram	Ansiedade	Náusea, cefaléia, disfunção sexual e vertigem	Muito comum para paroxetina e menos reportado para a fluoxetina
	Escitalopram			
	Fluoxetina			
	Fluvoxamina			
	Paroxetina			
	Sertralina			
SNRI	Duloxetina Venlafaxina	Ansiedade e incontinência urinária	Náusea, tontura, vertigem e disfunção sexual	Existente
RIMA	Moclobemida	Ansiedade social	Bem tolerada	Não há relatos
NaSSa	Mirtazapina Mianserina		Sedação e ganho de peso	Não há relatos

TCAs- antidepressivos tricíclicos, SSRI- inibidores seletivos da recaptação de serotonina, SNRI – inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina, RIMA – inibidores reversíveis da monoamino oxidase A, NaSSa –receptores noradrenérgicos e serotoninérgico.

I.1.4 Monitorização terapêutica

Os poucos estudos clínicos existentes no tratamento da depressão em idosos relatam que os antidepressivos têm sido prescritos no intervalo terapêutico, porém esses indivíduos têm apresentado alta descontinuidade no tratamento, devido aos efeitos adversos que essas dosagens podem acarretar. Dessa forma, o risco de recorrência é alto para esses indivíduos ¹⁹.

A monitorização terapêutica nesses indivíduos é uma ferramenta essencial para garantir a eficácia e prevenir a toxicidade desses fármacos ²⁹.

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 ³⁰.

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 desse 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 inter individual na farmacocinética, e resposta clínica não facilmente ou não imediatamente mensurável ³¹.

A aplicação clínica da monitorização terapêutica tem sido indicada em situações que 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 ³⁰.

Os pacientes idosos acometidos por doenças psiquiátricas, em geral, fazem uso de uma ampla gama de outros medicamentos, sendo submetidos a polifarmacoterapia procurando obter o melhor controle dos sintomas apresentados por esses pacientes. Dessa forma, a monitorização terapêutica nesses pacientes é de extrema importância, uma vez que, existe uma grande variabilidade inter individual nos níveis plasmáticos para os antidepressivos e seus metabólitos ativos ³². Além disso, assegurar a concentração plasmática nesses indivíduos aumenta a eficiência do tratamento e reduz a existência de efeitos adversos, podendo aumentar, assim, a eficácia e a continuidade do tratamento ¹⁴.

O desenvolvimento de métodos analíticos rápidos e específicos para a determinação de antidepressivos em fluidos biológicos tem sido requerido, tanto para monitorização terapêutica quanto para análises toxicológicas de urgência ^{14, 33-35}.

I.1.5 Métodos Analíticos

A determinação de fármacos em amostras biológicas, principalmente em amostras de 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 ³⁶.

Há uma necessidade contínua por procedimentos analíticos, mais rápidos, seletivos, robustos, de baixo custo, menos tóxicos e que resultem em baixos limites de quantificação (**LOQ**) ³⁷. 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 antidepressivos), extração e pré-concentração dos solutos; têm sido um procedimento indispensável e extremamente importante para o desenvolvimento de métodos cromatográficos com sensibilidade e seletividade analítica adequados às análises de fármacos no intervalo terapêutico.

Os métodos convencionais, empregados no preparo de amostras biológicas para análises de antidepressivos por técnicas cromatográficas, têm sido a extração líquido-líquido (**LLE**) e extração em fase sólida (**SPE**) ^{21, 29, 38 - 42}.

De acordo com a literatura os métodos convencionais LLE e SPE têm sido empregados nas análises de antidepressivos em fluidos biológicos, para fins de monitorização terapêutica ou propósitos toxicológicos (Tabela I.2) ^{38 - 42}.

A técnica de extração líquido-líquido apresenta desvantagens, tais como, consumo de solventes orgânicos de alta pureza, exposição do analista a compostos tóxicos, requer à concentração da fase orgânica, várias etapas para sua execução e formação de emulsão entre as fases, o que resulta na perda do soluto ^{43, 45}.

Tabela I.2. Métodos convencionais empregados às análises de antidepressivos.

Antidepressivo	Matriz biológica	Método de Análise	Taxa de recuperação	Ref.
amitriptilina, nortriptilina, imipramina, desipramina, clomipramina	Plasma e soro	LLE / LC -UV Hexano, pH 11	92 - 105%	38
sertralina	Plasma	LLE / CG - MS, em pH alcalino após desproteínização e perfluoroacetilação com HFBA	80 - 85%	39
Sertralina, citalopram, amitriptilina, nortriptilina, imipramina, desipramina, clomipramina	Plasma e soro	SPE / LC – UV pH 6,0 Eluição com 1 mL de solução: 2-propanol, amônia(25%) e diclorometano (20:2:78 v/v/v)	75 - 99%	40
sertralina	plasma	SPE / LC – UV Eluição : 1 mL de metanol	> 90%	41
citalopram	plasma	SPE / LC -UV, pH alcalino Eluição com 2 mL 2% HAc-metanol	> 95%	42

A extração em fase sólida apresenta uma grande variedade de fases extratoras, resultando em diferentes tipos de interações com os analitos. Esse 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, a utilização de solventes orgânicos para a eluição, as variações analíticas entre cartuchos extratores e as várias etapas operacionais para sua execução ^{44 - 47}.

A miniaturização dos sistemas analíticos tem sido uma convergência predominante na área de química analítica. A microextração em fase sólida (**SPME - solid-phase microextraction**), “*in-tube*” **SPME** e a extração sortiva em barra de agitação (**SBSE - stir bar sorptive extraction**) são exemplos típicos de técnicas de preparo de amostra miniaturizadas. Essas técnicas quando hifenadas a sistemas analíticos têm resultado em análises rápidas, baixo consumo de solvente, menor exposição dos analistas aos fluidos biológicos e aos solventes tóxicos, assim como, maior precisão analítica.

A **SPME** utiliza uma fibra de sílica fundida recoberta com uma fase extratora polimérica, em que os solutos são diretamente extraídos da amostra para o recobrimento da fibra. Consiste de um processo baseado no equilíbrio de partição entre as fases: aquosa (amostra homogênea), polimérica extratora (fibra) e gasosa. Durante a extração em um sistema trifásico considerado ideal, os analitos migram entre as três fases até que o equilíbrio de partição seja atingido. Dessa forma, a massa extraída do analito pela fibra está relacionada ao equilíbrio de massas nas fases do sistema ^{45 - 56}.

Dentre as desvantagens da técnica **SPME**, pode-se destacar, baixa estabilidade das fases extratoras na presença de solventes orgânicos ou em solução tampão em valores de pH extremos, número limitado de fases extratoras disponíveis no comércio, as quais são adequadas somente para a análise de solutos não iônicos, e adsorção irreversível dos compostos endógenos da matriz junto às fases extratoras, diminuindo a eficiência do processo de extração. Para superar estas dificuldades o uso de detectores

mais seletivos ou de alta sensibilidade analítica, assim como modificações químicas da matriz biológica têm sido requeridas para aumentar a sensibilidade analítica do método padronizado. Desta forma, o desenvolvimento de novas fases extratoras mais seletivas, estáveis e de baixo custo, tem sido necessário para o desenvolvimento de métodos cromatográficos, com sensibilidade analítica adequada (contemplando o intervalo terapêutico) para análise de fármacos em fluidos biológicos.

O poli(pirrol) (**PPY**) tem sido avaliado como nova fase extratora SPME, devido às propriedades físico-químicas, que podem resultar em interações entre a fase extratora e o soluto do tipo: hidrofóbicas, ácido base e $\pi - \pi$. Trabalhos recentes apontam o PPY como promissora fase extratora para análise de compostos básicos (como alguns fármacos) em fluidos biológicos, empregando a técnica “*in tube*” SPME ^{56 - 62}.

Seguindo os fundamentos teóricos da **SPME**, recentemente foi desenvolvida a extração sortiva em barra de agitação (**SBSE**), em que a barra de agitação magnética é recoberta com a fase extratora de polidimetilsiloxano (PDMS) ⁵³.

A **SBSE** com dessorção térmica, no injetor do cromatógrafo em fase gasosa tem apresentado taxas de extração e limites de quantificação satisfatórios para análises de fármacos em matrizes aquosas ou biológicas ^{62 - 65}. No entanto, a técnica **SBSE** para análises por LC, com dessorção líquida ainda requer maior investigação.

I.2 OBJETIVOS

Avaliação do método extração sortiva em barra de agitação empregando cromatografia líquida com detecção UV-vis (**SBSE/LC-UV**) para análise de antidepressivos tricíclicos e não tricíclicos em amostras de plasma de pacientes idosos. Assim como, a otimização das variáveis pertinentes à técnica SBSE e a validação analítica do método proposto.

O desenvolvimento da fase extratora de poli(pirrol) eletrodepositada em eletrodo de aço inox e seu emprego nas análises **SPME-PPY/LC-UV** (microextração em fase sólida com a fase extratora de poli(pirrol) empregando a cromatografia líquida com detecção em UV-vis) com dessorção “off-line”, para determinação de antidepressivos não-tricíclicos em amostras de plasma de pacientes idosos.

I.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KENDELL, R. E. *The classification of depressive illness*, London, Oxford, U. P., p.1-3, 1968.
2. KENNEDY, S. A review of antidepressants treatment today. *European Neuropsychopharmacology*, v. 16, p. S619 – S624, 2006.
3. KISS, J. P. Theory of antidepressants: A nonsynaptic approach to the treatment of depression. *Neurochemistry International*, v. 52, p. 34 – 39, 2007.
4. ARAGONES, E.; PINOL, J. L.; LABAD, A. Depression and physical comorbidity in primary care. *Journal of Psychosomatic Research*, v. 63, p. 107 – 111, 2007.
5. 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. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 25, n.2, p.114 -122, 2003.
6. MORENO, R. A., MORENO, D. H. e SOARES, M. B. M. Psicofarmacologia de antidepressivos. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 21, p. 24 - 40, 1999.
7. KOZISEK, M. E.; MIDDLEMAS, D.; BYLUND, D. B. Brain-derived neurotrophic factor and its receptor tropomyosin-related kinase B in the mechanism of action of antidepressant therapies. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 117, p. 30 – 51, 2008.

8. BERRA, C.; TORTA, R. Therapeutic rationale of antidepressants in the elderly. *Archives of Gerontology Geriatrics Supplements*, v. 1, p. 83 – 90, 2007.
9. BUFFUN, M. D.; BUFFUN, J. C. Treating depression in elderly: an update on antidepressants. *Geriatric Nursing*, v.26, n. 3, p. 138 – 142, 2005.
10. TURNHEIN, K. When drug therapy gets old: pharmacokinetics and pharmacodynamics in the elderly. *Experimental Gerontology*, v. 38, n. 8, p. 843 – 853, 2003.
11. LUNGEN, A. S. Pharmacology update: Depression Geriatric. *Nursing*, v. 26, n. 3, p. 197 – 200, 2005.
12. KOMPOLITI, K.; GOETZ, C. G. Neuropharmacology in the elderly. *Neurology Clinic in North America*, v. 16, p. 599 – 610, 1998.
13. GRUNEBAUM, M. F.; OQUENDO, M. A.; MAINLY, J. J.; Depressive symptoms and antidepressants use in a random community sample of ethnically diverse, urban elder person. *Journal of affective disorders*, v. 105, p. 273 -277, 2008.
14. MANDELLI, L.; SERRETTI, A.; ZANARDI, R.; ROSSINI, D.; DE RONCHI, D.; TARRICONE, I. ; COLOMBO, C. Antidepressants response in the elderly. *Psychiatric Research*, v. 152, p. 37 - 42, 2008.
15. NASH, J.; NUTT, D. Antidepressants: Specific treatment and disorders. *Psychiatric*, v. 6, n. 7, 289 – 294, 2007.
16. BATEMAN, D. N. Antidepressants: poisonous substances. *Medicine*, v. 35, n. 11, p. 287 -289, 2007.

17. MUNOZ-ARROYO, R.; SUTTON, M.; MORRISON J. Exploring potencial explanations for the increase in antidepressants prescribing in Scotland using secondary analyses of routine data. *Journal of Genitcs Practices*, v. 56, p. 423 -428, 2006.

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

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

20. BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. Goodman and Gilman: *As bases farmacológicas da terapêutica*, 11º ed., p. 383 - 403, 2005.

21. TITIER, K., CASTAING, N., SCOTTO-GOMEZ, E., PEHOURECQ F., MOLIMARD, M. High-Performance Liquid Chromatographic Method with Diode Array Detection for Identification and Quantification of the Eight New Antidepressants and Five of Their Active Metabolites in Plasma after Overdose. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 25, p. 581-587, 2003.

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

23. PENG, Q, MASSUDA, N.; JIANG, M.; LI, Q.; ZHAO, M.; ROSS, C. A.; DUAN, Z. The antidepressant sertraline improves the phenotype, promotes neurogenesis and increase BDNF levels in the R6/2 Huntington's disease mouse model. *Experimental Neurology*, doi:10.1016/j.expneurol.2007.10.1015, 2007.

24. SHIN, J.-G.; KIM, K.-A.; YOON, Y.-R.; CHA, I.-J.; KIM, Y.-H.; SHIN, S.-G. Rapid simple high-performance liquid chromatographic determination of paroxetine in human plasma. *Journal of Chromatography B*, v. 713, p. 452 – 456, 1998.

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

26. MERCOLINI, L.; MANDRIOLI, R.; CAZZOLA, R.; AMORE, M.; RAGGI, M. A. HPLC analysis of the novel antidepressant duloxetine in human plasma after an original solid-phase extraction procedure. *Journal of Chromatography B*, v. 858, p. 81 – 87, 2007.

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

28. PTÁČEK, P.; KLIMA, J.; MACEK, J. Determination of mirtazapine in human plasma by liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 794, p. 323 – 328, 2003.

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

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

31. WORDEN, J. P. Therapeutic drug monitoring. *Current Surgery*, v. 51, n. 7, 4299-4435, 1994.

32. MANDRIOLI, R.; MERCOLINI, L.; FERRANTI, A.; FURLANETO, S.; BONCOMPAGNI, G.; RIGGI, M. A. Determination of antidepressant paroxetine and its three main metabolite in human plasma by liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, v.591, p. 141 -147, 2007.

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

34. MALFARA, W. R.; BERTUCCI, C.; QUEIROZ, M. E. C.; CARVALHO, S. A. D.; BIANCHI, M. L. P.; CESARINO, E. J.; CRIPPA, J. A.; QUEIROZ, R. H. C. Reliable HPLC method for therapeutic drug monitoring of frequently prescribed tricyclic and nontricyclic antidepressants. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 44, p. 955 - 962, 2007.

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

36. 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*, v. 28, n. 5, p. 880 – 886, 2005.

37. THEODORIS, G.; KOSTER, E. H. M.; JONG, G. J. Solid-phase microextraction for analysis of biological samples. *Journal of Chromatography B*, v. 745, p. 49 -82, 2000.

38. THEURILLAT R., THORMANN W. Monitoring of tricyclic antidepressants in human serum and plasma by HPLC: characterization of a simple, laboratory developed method via external quality assessment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 18, n. 4 -5, p. 751 – 760, 1998.
39. KIM, K.M.; JUNG, B.H.; CHOI, M.H.; WOO, J.S.; PAENG, K.J.; CHUNG, B.C. Rapid and sensitive determination of sertraline in human plasma using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 769, p. 333 – 339, 2002.
40. FRAHNERT, C.; RAO, M.L.; GRASMADER, K. Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring. *Journal of Chromatography B*, v. 794, p. 35 - 47, 2003.
41. MANDRIOLI, R.; SARACINO, M.A.; FERRARI, S.; BERALDI D.; KENNDLER E.; RAGGI M.A. HPLC analysis of the second-generation antidepressant sertraline and its main metabolite N-desmethylsertraline in human plasma. *Journal of Chromatography B*, v. 836, p. 116 – 119, 2006.
42. JUAN, H.; ZHILING, Z.; HUANDE, L. Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/ESI). *Journal of Chromatography B*, v. 820, p. 33 – 39, 2005.
43. FRAHNERT, C.; RAO, M. L.; GRASMADER, K. Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotic and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring. *Journal of Chromatography B*, v. 794, p. 35- 47, 2003.

44. 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*, v. 40, n. 3 , p. 509 - 515, 2006.
45. WALLES, M., MULLETT, W. M., PAWLISZYN, J. Monitoring of drugs and metabolites in whole blood by restricted-access solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1025, n. 1, p. 85 - 92, 2004.
46. ZAMBONIN, C. G., ARESTA, A., PALMISANO, F. Determination of the immunosuppressant mycophenolic acid in human serum by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 806, n. 2, p. 89 - 93, 2004.
47. ARESTA, A., PALMISANO, F., ZAMBONIN, C. G. Determination of naproxen in human urine by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 39, n. 3 - 4 , p. 643 - 647, 2005.
48. TOURNEL, G.; HOUDRET, N.; DEVEAUX, M.; GOSSET, D.; LHERMITTE, M. High-performance liquid chromatography method to screen and quantities seven serotonin reuptake inhibitors in human serum. *Journal of Chromatography B*, v. 761, p. 147 - 158, 2001.
49. 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. *Journal of Chromatographic Science*, v. 40, n. 4, p. 219 - 223, 2002.

50. 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, *Journal of Chromatography B*, v. 794, n. 2, p. 337 – 342, 2003.

51. LLERENA, A.; DORATO, P.; BERECZ, R.; GONZALEZ, A.; CACERES, M. J. Determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection in psychiatric patients. *Journal of Chromatography B*, v. 783, p. 25 – 31, 2003.

52. QUEIROZ, M. E. C., LANÇAS, F. M. Practical Tips on Preparing Plasma Samples for Drug Analysis Using SPME. *LCGC North America*, v. 22, n. 10, 2004.

53. KATOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, n. 4, p. 232 – 244, 2003.

54. PAWLISZYN, J. *Applications of solid phase microextraction*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999.

55. DIETZ, C.; SANZS, J.; CAMARA, C. Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques. *Journal of Chromatography A*, v. 1103, p. 183 -192, 2006.

56. LORD, H., PAWLISZYN, J. Microextraction of Drugs. *Journal of Chromatography A*, v. 902, n. 1, p. 17 - 63, 2000.

57. ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 902, n.1, p. 167 - 194, 2000.

58. WU, J.; PAWLISZYN, J. Preparation and application of polypyrrole films in solid-phase microextraction *Journal of Chromatography A*, v. 909, p. 37-52, 2001.
59. WU, J.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction based on polypyrrole films with different counter ions. *Analytica Chimica Acta*, v. 520, p. 257-264, 2004.
60. 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*, v. 54, p. 655- 672, 2001.
61. WU, J.; LORD, H.; PAWLISZYN, J.; KATAOKA, H. Polypyrrole-coated capillary soli-phase microextraction coupled with liquid chromatography-elctrospray ionization mass spectrometry for the determination of β -blockers in urine and serum samples *Journal of Microcolumn Separations*, v.12, p. 255 - 266, 2000.
62. STOPFORTH, A.; BURGER, B. V.; CROUCH, A. M.; SANDRA, P. Uanalysis of 4- hidroxynonenal, a marker of oxidative stress, using stir bar sortive extraction-thermal desorption-gas chromatography/ mass spectrometry. *Journal of Chromatrography B*, v. 834, p. 134 -140, 2006.
63. STOPFORTH, A.; GROBBELAAR, J. C.; CROUCH, A. M.; SANDRA, P. Quantification of testosterone and epitestosterone in human urine samples by stir bar sorptive extraction- thermal desorption-gas chromatography/ mass spectrometry: Application to HIV- positive urine samples. *Journal of Separation Science*, v. 30, p. 257-265, 2007.
64. NENG, N. R.; CORDEIRO, C. A. A.; FREIRE, A. P.; NOGUEIRA, J. M. F. Determination of glyoxal and methylglyoxal in environmental and

biological matrices by stir bar sorptive extraction with *in-situ* derivatization. *Journal of Chromatography A*, v. 1169, p. 47 – 52, 2007.

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

CAPÍTULO II

II.I INTRODUÇÃO

II.1.1 Extração sortiva em barra de agitação

Baltussen e colaboradores ¹, entre 1999 e 2000 desenvolveram um método de extração sortiva, utilizando uma barra de agitação magnética revestida com polidimetilsiloxano (**PDMS**) (fase extratora), a qual foi denominada extração sortiva em barra de agitação (**SBSE**) ¹.

Para **SBSE**, a barra de agitação magnética revestida com PDMS tem sido inserida diretamente na amostra ou no “headspace” e agitada até atingir o equilíbrio de partição dos solutos entre as fases extratora e aquosa (amostra). Após sorção dos solutos na fase extratora, esses têm sido termicamente dessorvidos no injetor de um cromatógrafo a gás, resultando em uma técnica simples e de alta sensibilidade para análise de solutos voláteis e semi-voláteis.

Para as análises de compostos termolábeis ou de alta massa molar, através da técnica, cromatografia líquida (**LC**), o processo de dessorção SBSE tem sido realizado em uma alíquota de solvente adequado. Poucas referências bibliográficas descrevem a técnica SBSE-LC empregando a dessorção “off-line”.

O volume de polidimetilsiloxano utilizado para o revestimento das barras **SBSE**, 24 - 126 μL , tem sido maior quando comparado aos revestimentos utilizados em microextração em fase sólida (**SPME**) 0,5 μL para a fibra com o filme de maior espessura, 100 μm ². Consequentemente, a técnica SBSE apresenta a maior sensibilidade analítica, sensibilidade, 50 a 250 vezes quando comparada à **SPME**, reduzindo os limites de quantificação a níveis de sub-ng mL⁻¹.

II.1.1.1 Princípios teóricos da SBSE

O princípio da técnica SBSE baseia-se no processo de partição (absorção), assim como a extração líquido - líquido. No entanto, a técnica SBSE não utiliza solvente orgânico, ou apenas uma pequena alíquota, no processo de dessorção, quando as análises são realizadas por cromatografia líquida. No processo de adsorção, os solutos interagem com os sítios ativos presentes na superfície da fase extratora, já na extração absorbtiva (**SBSE**) os solutos solubilizam na fase extratora (PDMS). Consequentemente, o volume e a área superficial de fase extratora influenciarão nas taxas de recuperação da técnica SBSE ³⁻⁵.

As fases sortivas são materiais poliméricos, homogêneos, não porosos, os quais foram desenvolvidos em temperaturas acima do seu ponto de transição vítrea (T_g). Nesta faixa, os polímeros adquirem aspecto de goma e comportam-se similarmente a solventes orgânicos no estado líquido ⁵.

O polidimetilsiloxano (**PDMS**) (Figura II.1), em razão de suas propriedades de difusão e estabilidade térmica em ampla faixa de temperatura (atua como líquido entre -20 a 320°C), tem sido muito utilizado como fase de extração sortiva, assim como fase estacionária em cromatografia gasosa (**GC**).

Figura II.1. Estrutura do oligômero de PDMS.

As vantagens do emprego da fase extratora PDMS podem ser atribuídas às taxas de extração próximas a 100%, alta estabilidade, baixa reatividade e rápida dessorção térmica em temperaturas medianas ³⁻⁸.

Para amostras aquosas, a extração do soluto é baseada no coeficiente de partição dos solutos entre a fase de silicone e a fase aquosa. Alguns autores correlacionam o coeficiente de partição (**SBSE**) com o coeficiente de distribuição octanol - água ($K_{o/w}$). Embora não seja totalmente correto, o coeficiente de distribuição octanol - água nos dá um bom indicativo da eficiência da extração (**SBSE**) para um soluto específico quando utilizada a fase extratora PDMS ^{3, 9 - 11}.

O coeficiente de partição ($K_{PDMS/w}$) do soluto nas fases PDMS e água é definido como sendo a razão entre as concentrações do soluto na fase de PDMS (C_{PDMS}) e na fase aquosa (C_w) no equilíbrio. Essa razão é igual ao produto entre razão das massas do soluto na fase PDMS (m_{PDMS}) e na fase aquosa (m_w) e a razão das fases β (sendo $\beta = V_w / V_{PDMS}$) ⁹, sendo diretamente dependente da quantidade de PDMS da fase extratora. Essa relação é ilustrada na Equação 1.

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

Equação 1

A taxa de recuperação, Equação 2, é expressa por meio da razão entre a quantidade de soluto extraído (m_{PDMS}) e a quantidade inicial de soluto em água ($m_o = m_{PDMS} + m_w$) que corresponde às correlações entre o coeficiente de distribuição $K_{PDMS/\beta}$ e a razão dos volumes das fases (β), como ilustra a Equação 2:

$$\frac{m_{PDMS}}{m_o} = \frac{\frac{K_{PDMS/w}}{\beta}}{1 + \frac{K_{PDMS/w}}{\beta}} \quad \text{Equação 2}$$

Segundo a Equação 2, quanto maior a quantidade de PDMS, menor o β e maior a eficiência de extração; uma vez que o valor de K_{PDMS} é similar ao valor de $K_{o/w}$, a eficiência da extração em PDMS, em geral, diminui com o aumento da polaridade do soluto.

Para as análises **SPME**, com fibra PDMS (100 μ m, 0,5 μ L), em 10 mL de amostra aquosa, a razão entre as fases β é da ordem de 20000 resultando em baixa recuperação, para solutos com baixos valores de $K_{o/w}$. A **SPME** de solutos com log de $K_{o/w} = 3$ resulta em recuperação de somente 4,8%. Já para **SBSE** com uma barra magnética de 1 cm com 0,5 mm de fase extratora, o volume de PDMS é de 25 μ L e a razão β é 417 (para os mesmos 10 mL de amostra). A **SBSE** de solutos com log $K_{o/w} = 3$ no mesmo volume de amostra resulta em recuperação de 71%. Dessa forma, nas determinações quantitativas SBSE para solutos com baixos valores de $K_{o/w}$, têm sido obtidas taxas de recuperação próximas a 100%^{3,9}.

As barras de agitação magnéticas revestidas com PDMS Twister tem sido adquiridas no comércio fabricadas por Gerstel GmbH (Mülheim na der Ruhr, Alemanha). Essas barras apresentam três partes essenciais (Figura I.2). A primeira e mais interna é uma haste de aço inox de agitação magnética, que é necessária para o movimento rotacional da amostra líquida. A segunda parte uma capa de vidro que recobre a haste de agitação. A terceira e mais externa das partes, a camada de PDMS, onde ocorre a extração dos solutos. Essa camada de

vidro previne a decomposição da camada de PDMS, a qual pode sofrer reações catalíticas em contato direto com a haste metálica ³.

Figura II.2. Ilustração da barra de agitação magnética com o recobrimento de PDMS.

Recentemente, outras fases extratoras **SBSE** têm sido desenvolvidas. Liu e colaboradores ¹² utilizaram a tecnologia sol-gel para o desenvolvimento de um revestimento misto de PDMS e poli(metilhidrosiloxano) ¹³. Essa fase extratora foi avaliada para análise de hidrocarbonetos aromáticos em amostras de água. O método padronizado apresentou limites de quantificação de 0,18 - 20 pg mL⁻¹.

Com o objetivo de aumentar a seletividade da técnica SBSE, Lambert e colaboradores¹⁰ desenvolveram uma fase extratora empregando como revestimento, alquil-diol-silica (**ADS**). Nesse trabalho, os autores analisaram cafeína e seus metabólitos em fluidos biológicos, empregando a dessorção líquida e análises por LC - UV, obtendo recuperações de até 102%. As barras desenvolvidas por Lambert e colaboradores ¹⁰ puderam ser diretamente inseridas em fluidos biológicos sem que ocorresse sorção irreversível dos compostos endógenos, como as proteínas, junto à fase extratora. A barra

desenvolvida foi utilizada mais de 50 vezes, sem perda da eficiência de extração.

Outra técnica que vem ganhando atenção é a produção de moléculas sítio-específicas, as quais mimetizam o comportamento de sorção nos sítios dos receptores naturais, esse procedimento é realizado por meio da técnica conhecida como polímeros impressos molecularmente. Xiaolan e colaboradores ¹³ desenvolveram uma fase molecularmente impressa para **SBSE**, utilizando nylon-6 para análise de organofosforados em solventes orgânicos.

Bicchi e colaboradores ¹⁴ desenvolveram uma fase extratora mista para SBSE composta de material adsorvente e sorvente. Nesse trabalho, os autores empregam um tubo de PDMS empacotado com carbono ativado, cujas extremidades foram fechadas com material magnético para promover a agitação. A barra foi empregada nas análises de café, folhas de sálvia, uísque e atrazina, com coeficientes de variação inferiores a 16,9% e taxas de recuperação próximas a 80%, superiores aos valores encontrados com as barras SBSE comerciais.

Queiroz e Lanças ² recentemente desenvolveram um revestimento SBSE misto de PDMS (absorção) e poli(pirrol) (adsorção) para análises de antidepressivos não tricíclicos em amostras de plasma, para fins de monitorização terapêutica. O método padronizado e validado de extração sortiva em barra de extração PDMS/PPY e análises por cromatografia líquida **SBSE/LC-UV** apresentaram limites de quantificação de 20 a 30 ng mL⁻¹, taxas de recuperação de 50 a 90% e precisão inter ensaio com coeficiente de variação inferiores a 15%.

II.1.1.2 Procedimento de Extração

Nas extrações **SBSE**, a barra de agitação magnética revestida com PDMS tem sido inserida diretamente na amostra ou no “headspace” (Figura II.3) e agitada até atingir o equilíbrio de partição dos solutos entre a amostra e fase extratoras ¹⁵. O frasco extrator (com tampa de rosca) tem sido colocado sobre o agitador magnético e a amostra agitada até atingir o equilíbrio de partição cerca de 30 a 240 minutos. Após o processo de extração, a barra de PDMS é retirada do frasco, com o auxílio de uma pinça ou de uma haste de aço inox, enxaguada levemente com água milli-Q e cuidadosamente seca com um lenço de papel macio, para remoção de possíveis moléculas de água, açúcares, proteínas ou outros componentes da amostra.

Os solutos têm sido dessorvidos termicamente (**TD**) ou em solvente (**LD**), dependendo das características do soluto e do sistema de análise. Para a dessorção térmica, a etapa de lavagem da barra previamente à dessorção é de extrema importância, pois previne a sorção de compostos não voláteis na barra. A lavagem não resulta em perda do soluto, pois este encontra-se sorvido na fase PDMS ^{4,16}.

DIRETA

▲HSSE例

“HEADSPACE”

Figura II.3. Modo de extração SBSE : DIRETA e “HEADSPACE” ¹⁷.

O processo **SBSE** com dessorção térmica pode ser totalmente automatizado, dois sistemas disponíveis no comércio são encontrados: o sistema de dessorção térmica clássica e outro especialmente desenvolvido para a dessorção da barra Twister (ambos da Gerstel). Esses sistemas foram especialmente desenvolvidos para serem acoplados a um cromatógrafo a gás equipado com injetor com temperatura programada. O injetor com temperatura programada é operado com um “criotrap” para concentração criogênica dos solutos termicamente dessorvidos (Figura II.4) ⁴. O sistema de dessorção térmica opera da seguinte forma: a barra de PDMS é introduzida em um tubo de vidro (interface) e encaminhada para o injetor de temperatura programada, para rápida dessorção térmica dos solutos. Posteriormente, os solutos dessorvidos termicamente são concentrados à baixa temperatura (-150°C) sob fluxo de nitrogênio líquido (concentração criogênica dos solutos). Após total concentração dos solutos, inicia-se o aumento gradual da temperatura e os solutos são transportados à coluna cromatográfica para a separação.

Devido ao maior volume de fase PDMS, o processo de dessorção SBSE é mais lento quando comparado com a técnica SPME; porém, tem apresentado maiores taxas de recuperação ⁹.

Duas ou mais barras SBSE podem ser simultaneamente dessorvidas para o aumento da sensibilidade analítica. Segundo a Equação 2, nas extrações realizadas com uma única barra de extração, com grande volume de amostra observa-se diminuição da quantidade de soluto extraído pela fase PDMS. Em adição, o aumento no volume da amostra, resulta no aumento de β e, conseqüentemente, no aumento no tempo de extração. Quando um sistema de dessorção térmica simultânea de barras **SBSE** é empregado, o valor β , assim como o tempo de extração não aumenta e a eficiência da extração não diminui. Desse modo, o uso desse sistema aumenta a sensibilidade analítica do método ¹⁸.

Ochiai e colaboradores ¹⁹ realizaram a dessorção térmica simultânea de duas barras PDMS, após extrações **SBSE** distintas; ampliando, desta forma, o leque de aplicações da técnica.

Figura II.4. Princípio de extração SBSE. 1 - Extração direta; 2 - Transferência para o tubo de dessorção térmica; 3 - Unidade de dessorção térmica e 4 - Sistema de injeção com controle de temperatura ⁴.

Como mencionado anteriormente, a dessorção pode ser realizada na presença de solventes. Para dessorção líquida, a barra PDMS, após processo de extração, tem sido inserida em um outro frasco contendo alguns mL de solvente ou mistura de solventes (fase móvel) adequados à dessorção e agitada por determinado tempo, semelhante ao processo de extração (Figura II.5). Outra alternativa é a inserção da barra PDMS em um frasco cônico contendo aproximadamente 250 μ L de solvente, para dessorção em banho de ultra-som por determinado tempo, o qual deverá ser otimizado. O extrato obtido poderá ser analisado por cromatografia gasosa ou líquida, segundo propriedades físico-químicas do soluto.

Benanou e colaboradores ²⁰ descreveram que a barra PDMS, após a extração, pode ser armazenada a 4°C por até uma semana sem perda significativa do soluto; ampliando uma nova perspectiva para a extração e amostragem *in loco*.

A barra PDMS, dependendo da complexidade da matriz analisada, tem sido reutilizada de 20 a 50 vezes sem perda da eficiência do processo **SBSE**.

Figura II.5. Dessorção líquida “off-line” **SBSE** ¹⁷.

II.1.1.3 Otimização do Processo SBSE

A otimização das variáveis **SBSE** permite o aumento da eficiência do processo de extração e menor tempo de análise ^{4 - 11}

Durante o processo de extração, os solutos migram da amostra para a fase PDMS. A difusão dos solutos para a fase extratora é controlada cineticamente, sendo afetada pelo volume da amostra, velocidade de agitação, dimensões da barra de agitação e do revestimento, devendo ser otimizado para cada análise proposta ²⁰.

Para solutos apolares ($\log K_{o/w} > 3$) a quantidade de soluto extraído aumenta proporcionalmente com o aumento do volume de amostra. No entanto, para solutos mais polares, o aumento linear das taxas de recuperação não tem sido observado. Dessa forma, para SBSE

tem sido necessário otimizar os volumes de amostra e de fase extratora, com base nos solutos e sensibilidade analítica desejada ⁵.

O aumento da temperatura favorece a difusão dos solutos, diminuindo o tempo necessário para atingir o equilíbrio de partição. No entanto, diminui o coeficiente de distribuição dos solutos com a fase extratora, variações aceitáveis encontram-se na faixa de 1 a 2°C ⁵.

Assim como para **SPME**, as extrações SBSE podem ser realizadas fora do equilíbrio de partição, desde que as variáveis SBSE sejam rigorosamente controladas e melhores resultados poderão ser obtidos com a adição de padrão interno. Porém, segundo Baltussen e colaboradores ⁵ o controle das variáveis em **SBSE** é menos rigoroso, pois a técnica **SBSE** apresenta taxas de recuperação próximas a 100%.

II.1.1.4 Análises Quantitativas

Para amostras de fluidos biológicos os componentes da matriz influenciam na eficiência da extração, assim sendo as curvas analíticas deverão ser preparadas com amostras biológicas isentas dos solutos (branco de referência) enriquecidas com os solutos em diferentes concentrações.

As determinações quantitativas deverão ser realizadas pelo método da padronização interna, sempre que possível utilizar padrões marcados por ¹³C deuterado, em concentrações em que o sinal analítico do padrão interno seja similar à concentração do soluto correspondente ao ponto central da curva analítica.

Fernandes e colaboradores ²¹ empregaram o método SBSE-LC-MS na análise de fluoxetina em amostras de plasma. Anterior ao processo SBSE, os autores realizaram a precipitação das proteínas do plasma com ácido tricloroacético 10% (m/v) no intuito de minimizar a influência destas no processo de extração. No entanto, os autores obtiveram taxas de recuperação analítica do fármaco de 57,54%. Segundo os autores, a baixa taxa de recuperação é decorrente da alta ligação do fármaco às proteínas do plasma.

II.1.1.5 Derivatizações

O uso de reagentes derivatizantes, para análises de solutos polares com baixo valor de $K_{o/w}$ tem resultado em espécies com maior $K_{o/w}$ e, por conseguinte, maiores taxas de recuperação e alta sensibilidade analítica ⁴.

Kawaguchi e colaboradores ²² apresentaram em artigo de revisão, alguns processos de derivatizações *in situ* empregadas para **SBSE**. Os principais relatos do uso de reações derivatizantes para **SBSE** estão relacionados à sua aplicação em fluidos biológicos, já que a maioria dos fármacos é polar.

Em **SBSE**, anidrido acético tem sido utilizado como reagente derivatizante, para a acetilação *in situ* (na amostra), em que o pH da amostra e o volume do reagente são parâmetros importantes na derivatização ²²⁻²³.

Uma alternativa ao processo *in situ* tem sido a dessorção térmica dos solutos da barra PDMS no injetor do cromatógrafo gasoso e

derivatização simultânea. Vários agentes de sililação podem ser empregados nesta técnica ²².

II.1.1.6 Aplicações

A técnica **SBSE** tem sido empregada com êxito, para diferentes fins, nas análises de diferentes fármacos nas mais diversas amostras biológicas, como: soro, plasma, urina, escarro ou esperma, empregando ou não, o processo de derivatização (Tabela II.1).

Tiepoint e colaboradores²⁴ analisaram 25 fármacos em amostras de urina por TD-CG-MS. O destaque desse trabalho está relacionado com a diversidade de fármacos analisados, assim como as altas taxas de recuperações obtidas para fármacos polares, estes foram derivatizados por dois reagentes diferentes: ácido anidrido acético e etil cloroformiato, antecedendo às extrações **SBSE**.

A análise de ácido tubérculo em escarro demonstra a aplicabilidade da técnica SBSE para análises de rotina. As análises foram realizadas em menor tempo (60 minutos) com precisão e exatidão equivalentes ao método padrão de diagnóstico convencional, o qual requer oito semanas para obtenção do resultado ²⁵.

A testosterona e epitestosterona foram analisadas em amostra de urina de pacientes HIV positivos por meio da técnica TD/GC-MS. Segundo os autores, os pacientes HIV positivos apresentam menor excreção destes hormônios. O método mostrou-se adequado com limites de quantificação de 0,9 ng mL⁻¹ para a testosterona e 208 ng mL⁻¹ para a epitestosterona ²⁶.

Tabela II.1. Aplicações da técnica SBSE para análise em fluidos biológicos

Referência	Soluto e matriz	Condições de extração	Deteção	LOQ ^A	Observações
Tienpont <i>et al.</i> ²⁴ 2003	Barbitúricos em urina	60 min a 1000 rpm	TD-CG-MS	Barbitúricos 1 µg L ⁻¹	Derivatização com etil cloroformiato e ácido anidrido acético
Kawasguchi <i>et al.</i> ²³ 2004	Alquilfenóis em urina e plasma	60 min, 25°C 500 rpm	TD-CG-MS	0,04 a 0,004 ng mL ⁻¹	Amostra diluída com água (1:1 v/v) sem a etapa de derivatização
Kawasguchi <i>et al.</i> ²⁷ 2004	Bisfenol A em urina, plasma e saliva	45-120 min a 500-1000 rpm	TD-CG-MS	20 pg mL ⁻¹ Urina 100 pg mL ⁻¹ Plasma 20 pg mL ⁻¹ Saliva	Amostra com pH ajustado (pH 10,5) Derivatização <i>in situ</i> , aumento da ensibilidade do método
Lambert <i>et al.</i> ¹⁰ 2005	Cafeína e metabólitos em plasma	30 min 1000 rpm	LC-UV	25 ng mL ⁻¹	Dessorção líquida ADS-RAM como revestimento SBSE ^E
Stopforth <i>et al.</i> ²⁹ 2005	Ácido tubérculo em escarro	30 min 1000 rpm	TD-CG-MS	0,2 ng mL ⁻¹	Antes da extração; os lipídios micobacterianos foram hidrolisados e derivatizados com formiato de etilcloro
Kawaguchi <i>et al.</i> ³⁰ 2005	Xenoestrógenos fenólicos em humana urina	150 min 1000 rpm	TD-CG-MS	10 - 50 pg mL ⁻¹	Derivatização com ácido anidrido acético
Kawaguchi <i>et al.</i> ³¹ 2005	Clorofenóis em urina	60 min, 500 rpm	TD-CG-MS	10 - 20 pg mL ⁻¹	Conjugação enzimática e derivatização com ácido anidrido acético
Stopforth <i>et al.</i> ²⁵ 2006	4-hidroxinonenol em urina	50 min, 42°C, 1100rpm	HD-TD-CG-MS ^F	22,5 pg mL ⁻¹	Derivatização em fase gasosa empregando ácido anidrido acético catalisado por piridina
Nogueira e Almeida ³² 2006	Hormônios em água e urina	4h, 750 rpm	LC-DAD	75 - 300 µg mL ⁻¹	Dessorção líquida, revestimento comercial ^G e otimização do processo de extração

Continuação na página seguinte

Tabela 1. Continuação da tabela 1.

Referência	Soluto e matriz	Condições de extração	Detecção	LOQ ^A	Observações
Fernandes <i>et al.</i> ²¹ 2006	Fluoxetina em plasma	30 min, 25°C, 900 rpm	LC - MS	3 ng mL ⁻¹	Precipitação de proteínas antecedendo o processo de extração
Stopforth <i>et al.</i> ²⁶ 2007	Testosterona e epitestosterona em urina	60 min, 50°C, 1100 rpm	TD-CG-MS	0,9 e 2,8 ng mL ⁻¹	Derivatização com ácido anidrido acético e otimização dos parâmetros de extração.
Neng <i>et al.</i> ²⁷ 2007	Glioxal metilglioxal em urina	90 min, 25°C, 1250 rpm	LC - DAD	45 e 75 ng mL ⁻¹	Derivatização com 2,3-diamina-minonaftaleno e dessorção líquida.
Huang <i>et al.</i> ²⁸ 2007	Esteróides em urina	1,5 h 600 rpm	LC - DAD	0,2 – 1,2 µg/ L	Fase extratora de material monolítico. Dessorção líquida em acetonitrila
Queiroz <i>et al.</i> ² , 2008	Antidepressivos não-tricíclicos	40 minutos a 40°C 1100 rpm	LC - UV	20 a 50 ng mL ⁻¹	Fase extratora de poli(pirrol) e PDMS. Dessorção líquida (fase móvel) em ultra-som.

^A LQ: limite de quantificação. ^B TD – GC – MS: dessorção térmica – cromatografia gasosa – espectrometria de massa ^C Metanol foi adicionado a solução da amostra para minimizar o efeito da adsorção pelo vidro. ^D DEHP: *Di-(2-ethylhexyl)phthalate*. ^E ADS-RAM: *aquil – diol – silica*, material de acesso restrito. ^F HD – TD – CG – MS derivatização em fase gasosa – derivatização térmica – cromatografia gasosa – espectrometria de massas.

II.2 OBJETIVOS

II.2.1 Padronização do método extração sortiva em barra de agitação e cromatografia líquida de alta eficiência (**SBSE/LC - UV**) para análise dos antidepressivos: mirtazapina, citalopram, paroxetina, imipramina, amitriptilina, fluoxetina e sertralina, em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica.

II.2.1.1 Otimização das condições cromatográficas (LC-UV).

II.2.1.2 Otimização das variáveis **SBSE**.

II.2.2 Validação analítica do método **SBSE/LC-UV** padronizado. Avaliação dos seguintes parâmetros de validação analítica: linearidade, precisão inter ensaios, recuperação, limite de quantificação, exatidão e especificidade.

II.2.3 Avaliação da aplicabilidade do método **SBSE/LC-UV** validado por análise de amostras de plasma de pacientes idosos em terapia com antidepressivos.

II.3 MATERIAIS E MÉTODOS

II.3.1 Padrões analíticos e reagentes

Os padrões primários dos antidepressivos fluoxetina, duloxetina foram gentilmente doados pelos laboratórios, Lilly (São Paulo, Brasil) e paroxetina foi doado por Libbs (São Paulo, Brasil), citalopram, mirtazapina, sertralina, moclobemida foram doados pela Roche (São Paulo, Brasil), imipramina pela Ciba-Geigy (São Paulo, Brasil), amitriptilina adquirida pelo fornecedor Aldrich Chemical Co (São Paulo, Brasil), nortriptilina pela Sandoz (São Paulo, Brasil), e clomipramina (padrão interno) pela Pfizer (São Paulo, Brasil).

As soluções padrão diluídas com os antidepressivos foram preparadas considerando-se o intervalo terapêutico, a partir da diluição de suas respectivas soluções estoques de 1 mg mL^{-1} em metanol. Essas soluções apresentaram estabilidade de 45 dias quando permanecidas a -20°C .

O metanol e a acetonitrila, grau HPLC foram adquiridos do fornecedor J.T. Backer (Phillipsburg, USA), cloreto de sódio, ácido acético, ácido clorídrico, borato de sódio, ácido tricloro acético, acetato de sódio da Mallinckrodt Baker (Xalostoc, México). A água utilizada nos ensaios foi purificada pelo sistema Milli-Q, Millipore (São Paulo, Brasil) apresentando condutividade de $18,2\text{ M}\Omega$.

II.3.2 Amostras de plasma de referência

As amostras de plasma branco de referência, livres dos fármacos em análise, e sorologia negativa para hepatite B e C, HIV, chagas, HTLV

I/II, TGP e sífilis foram cedidas pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP.

II.3.3 Amostras de plasmas de pacientes

As amostras de plasmas de pacientes idosos em tratamento com antidepressivos foram gentilmente doadas pela Prof^a. Dr^a. Regina Helena Costa Queiroz do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Essas amostras foram coletadas segundo critérios estabelecidos pelo comitê de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

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.

II.3.4 Acessórios SBSE

As barras de agitação magnética revestidas com polidimetilsiloxano, 0,5 mm de espessura e 10 mm de comprimento, foram adquiridas do fornecedor Gerstel GmbH (Müllheim Ruhr, Alemanha) (Figura II.6). Antes de serem utilizadas nas extrações, as barras foram condicionadas por 24 horas em metanol, sob agitação; entre as extrações sucessivas, as mesmas foram “lavadas” em metanol por 30 min a 50°C, sob agitação.

Figura II.6. Barra de extração sortiva revestida com PDMS ¹⁷.

II.3.5 Condições cromatográficas SBSE/LC-UV

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido *Varian*, modelo 230, equipado com injetor “Rheodyne”, alça de amostragem de 50 μL , detector Ultravioleta (*Varian*, modelo 310) e detector de arranjo de diodos (*Varian*, modelo 330), comprimento de onda selecionado em $\lambda = 230 \text{ nm}$. 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. Para a obtenção de satisfatória resolução cromatográfica dos fármacos, em menor tempo de análise, diferentes composições de fases móveis foram avaliadas (Tabela II.2).

Segundo os cromatogramas obtidos, a fase móvel composta pela solução tampão acetato de sódio 0,25 mol L⁻¹, pH 4,5, acetonitrila e metanol nas proporções em volume de 60:37:3 v/v/v com fluxo de 1 mL min⁻¹ no modo isocrático (fase móvel n° 9 – Tabela II.2) apresentou a melhor resolução cromatográfica com fator de retenção adequado. A fase móvel foi filtrada através de sistema de filtragem a vácuo com membrana de celulose adquirida pela Millipore e desgaseificada em banho de ultra-som por aproximadamente 20 minutos.

Tabela II.2. 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%	—

II.3.6 Otimização do processo SBSE

As variáveis do processo SBSE foram otimizadas para a obtenção de eficiente processo de extração em menor tempo de análise. A primeira variável avaliada foi a influência do pH da amostra. Para essa finalidade, as amostras de plasma enriquecidas com os antidepressivos foram diluídas em solução borato (0,05 mol L⁻¹) em quatro diferentes valores de pH: 8,0; 9,0; 10,0 e 11,0.

Para o processo de extração dos fármacos, a barra PDMS foi inserida em um frasco de vidro (15 mL) com tampa de rosca, contendo 1 mL de plasma enriquecido com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹ e 4 mL da solução tampão. A extração foi realizada à temperatura de 50°C com agitação magnética (1100 rpm), por 45 minutos. Após processo de extração, a barra de agitação, contendo os solutos sorvidos, foi retirada do frasco com o auxílio de uma pinça e

ligeiramente seca em lenço de papel, antes de seguir para o processo de dessorção dos solutos.

Os tempos de extração (15, 30, 45 e 60 minutos) foram avaliados concomitantemente às variações de temperatura (38,0; 50,0; 60,0 e 70,0°C).

Para a dessorção dos fármacos, a barra PDMS foi colocada em um frasco contendo acetonitrila. Esse processo foi realizado a 50 °C e sob agitação (1100 rpm). O tempo de dessorção foi avaliado em diferentes intervalos (5, 15, 30 e 60 minutos). O extrato resultante foi evaporado à secura e ressuspenso com 200 µL de fase móvel, sendo que 100 µL desse extrato foi injetado no sistema cromatográfico.

Outro processo de dessorção foi também avaliado nesse trabalho; a dessorção através de um banho de ultra-som. A barra de agitação, contendo os solutos sorvidos, foi imersa em um frasco de vidro cônico contendo alguns micro litros de fase móvel ou acetonitrila e então encaminhada ao banho de ultra-som à temperatura ambiente por diferentes tempos de dessorção (5, 10, 20 e 30 minutos).

A influência da força iônica no processo SBSE foi avaliada por meio da adição de 5% e 10% em massa de NaCl puro à matriz aquosa.

II.3.7 Validação analítica do método SBSE/LC-UV para análise simultânea de antidepressivos

A validação analítica foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pela agência regulamentadora, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (**ANVISA**) (Resolução RE nº 899) ³³, para análise de fármacos em fluidos biológicos.

Todos os parâmetros avaliados durante a validação analítica (especificidade, linearidade, limite de quantificação e repetitividade) foram realizados empregando-se a padronização interna, para tanto, utilizou-se a clomipramina como padrão interno.

II.3.7.1 Linearidade

A linearidade do método **SBSE/LC-UV** desenvolvido foi avaliada por meio das amostras de plasma branco de referência enriquecido com 50 µL de soluções de antidepressivos em seis diferentes concentrações: limite de quantificação, 50, 100, 300, 500 e 1000 ng mL⁻¹.

Cada ponto da curva foi avaliado em triplicata, sendo o valor médio e seus respectivos desvios considerados para construção da curva analítica ³¹.

II.3.7.2 Recuperação

Para os cálculos de recuperação, três níveis de concentração foram avaliados: baixa, média e alta. A recuperação relativa foi estimada segundo a Equação 3:

$$Rec = \left[\frac{A_{AE}}{A_{PIE}} \cdot \frac{A_{AP}}{A_{PIP}} \right] \cdot 100 \quad \text{Equação 3}$$

Em que:

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

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

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

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

II.3.7.3 Precisão inter ensaio

Representa o grau de repetitividade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio ³⁴. 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%.

A precisão inter ensaio foi estimada por meio do coeficiente da variação (%) das concentrações do soluto obtidas a partir da curva analítica. Foram realizadas cinco extrações em dias consecutivos em três níveis de concentrações.

O coeficiente de variação (CV) foi calculado usando a Equação 4:

$$CV(\%) = \frac{\rho}{X} \cdot 100 \quad \text{Equação 4}$$

Em que:

ρ representa o desvio padrão das medidas e

X a concentração média determinada.

II.3.7.4 Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência ³⁴.

A ANVISA preconiza que a exatidão deva ser estimada em três níveis de concentração (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação do método, realizando-se no mínimo cinco determinações por soluto ³⁴. O desvio não deverá exceder 15% (quinze por cento), exceto para o LQ, para o qual se admitem valores menores ou iguais a 20% (vinte por cento).

Desta forma, os valores de áreas obtidos para cada soluto no cálculo da precisão inter ensaio foram utilizados para cálculo da exatidão, empregando-se a Equação 5:

$$Exatidão(\%) = \frac{\overline{X}}{CT} \cdot 100 \quad \text{Equação 5}$$

Em que:

$\overline{X}$ representa a concentração média determinada para o soluto com base na curva analítica e;

CT representa a concentração teórica (adicionada).

II.3.7.5 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (**LOQ**) foi determinado por meio de extrações de amostras de plasma enriquecidas com soluções em concentrações decrescentes dos antidepressivos.

Os critérios adotados para estabelecer o limite de quantificação foram os seguintes: sinal anamítico do fármaco dez vezes maior que o ruído da linha de base do cromatograma e coeficiente de variação inferior a 20%.

II.3.7.6 Seletividade

Para avaliar a seletividade, seis diferentes amostras de plasma branco de referência foram avaliadas. As respostas dos possíveis interferentes foram inferiores a 20% do sinal analítico no tempo de retenção dos fármacos.

A seletividade do método proposto foi também avaliada por meio da comparação dos tempos de retenção dos solutos com os tempos de retenção de soluções padrão de outros fármacos que podem ser co-administrados com os antidepressivos em estudo.

II.4.1 Condições cromatográficas LC-UV

Em análises cromatográficas, a retenção de um soluto é determinada pelas forças de interações, soluto - fase estacionária e soluto - fase móvel. Essa interação é dependente das propriedades físico-químicas do soluto e da fase estacionária, como por exemplo, a composição da fase móvel e a temperatura de separação. O parâmetro mais utilizado para determinar o grau de retenção tem sido o fator de retenção (**k**), que pode ser expresso pela Equação 6 ³⁴.

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad \text{Equação 6}$$

Em que t_r é o tempo de retenção do soluto, tempo decorrente do momento da injeção à obtenção de altura máxima do sinal analítico e t_0 é o tempo de retenção de um componente não retido na coluna cromatográfica. Nesse estudo, foi empregada a Equação 7 para a determinação do t_0 .

$$t_0 = \frac{L \cdot d^2}{2F} \quad \text{Equação 7}$$

Em que L é o comprimento da coluna (cm), d o diâmetro da coluna (cm) e F o fluxo ou vazão (mL/min).

Quando **k** encontra-se entre 0,5 e 10,0, a separação cromatográfica dos solutos é considerada satisfatória.

A resolução cromatográfica (**R**) é uma medida quantitativa da separação de dois picos consecutivos, dada pela Equação 8 :

$$R = 2 \frac{\Delta t_r}{(w_{b1} + w_{b2})} \quad \text{Equação 8}$$

Em que Δt_r é a medida da separação dos máximos dos picos ($t_{r2} - t_{r1}$) e w_b é a largura média da base do pico. Valores de **R** próximos a 1,0 são considerados satisfatórios.

Diferentes condições cromatográficas foram avaliadas nesse estudo, para obtenção de resolução cromatográfica satisfatória em menor intervalo de tempo de análise.

A otimização da fase móvel foi iniciada com base em estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa, para a separação simultânea dos antidepressivos: mirtazapina, citalopram, paroxetina, desipramina, nortriptilina, imipramina, fluoxetina, amitriptilina, sertralina e clomipramina. A condição inicial adotada foi: tampão acetato 0,25 mol L⁻¹, pH 5,5 e acetonitrila 50:50, v/v. Com essa fase móvel foi observada a co-eluição dos fármacos fluoxetina e amitriptilina, além de um tempo de análise relativamente elevado (45 minutos). Para melhorar a separação desses fármacos, outras fases móveis foram avaliadas conforme Tabela II.3.

A diminuição do pH da solução tampão melhorou a resolução cromatográfica e reduziu o tempo de análise. Dessa forma, a solução tampão acetato com pH 4,5, na mesma concentração molar, 0,25 mol L⁻¹, foi adotada nos ensaios seguintes. A adição de isopropanol em todas as proporções avaliadas resultou na co-eluição da amitriptilina com a imipramina.

As variações nas proporções de acetonitrila também não resultaram em significativa melhora na resolução cromatográfica. Dessa forma, como alternativa, avaliou-se o aumento moderado e gradual da polaridade da fase móvel, por meio da adição de metanol.

Nas Tabelas II.3 e II.4 são ilustrados os fatores de retenção (k) e resolução cromatográfica dos fármacos nas diferentes fases avaliadas.

Segundo as Tabelas II.3 e II.4 a fase móvel número 9 (solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3, (v/v/v)) apresentou os melhores resultados tanto para o coeficiente de retenção quanto para a resolução cromatográfica. Além disso, com o emprego dessa fase, foi possível reduzir o tempo de análise.

Apesar da similaridade entre as estruturas dos antidepressivos em estudo, observou-se a completa separação entre os sete antidepressivos, bem como a separação destes com o padrão interno (clomipramina) empregado para a análise quantitativa.

A ordem de eluição dos antidepressivos está relacionada com os mecanismos de interação destes com a fase estacionária utilizada para análise. Como nesse estudo foi utilizada uma coluna analítica em fase reversa (C₁₈), os compostos que eluíram em menor tempo de análise são considerados os mais polares ou hidrofílicos.

Tabela II.3. Fator de retenção (k) para as diferentes fases móveis avaliadas.

Fármacos Fases	k								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Mirtazapina	2,9	2,9	3,0	3,0	1,8	2,8	—	2,1	3,3
Citalopram	—	3,6	—	3,9	—	3,5	—	—	4,3
Paroxetina	—	—	—	—	—	—	—	—	5,8
Imipramina	6,0	5,9	6,8	6,4	2,8	5,8	4,2	—	7,1
Fluoxetina	7,2	—	7,5	7,6	3,0	6,9	—	—	8,5
Amitriptilina	7,6	—	8,5	8,2	3,3	7,3	—	3,7	8,9
Sertralina	8,5	7,9	9,5	9,0	3,6	8,2	5,6	4,0	10,1
Clomipramina	10,0	9,4	11,1	10,7	4,1	9,6	6,5	4,7	11,9

(—) Co-eluição do fármaco.

Segundo a teoria para cromatografia por supressão iônica, o fator de retenção da amostra, k, aumenta para os compostos mais hidrofóbicos. Quando essas espécies neutras adquirem cargas, estas tornam-se menos hidrofóbicas ou mais hidrofílicas, diminuindo, portanto, sua retenção nas fases estacionárias reversas (apolares) ³⁵. Dessa forma, para compostos básicos a diminuição no valor de pH é responsável por ganho de prótons, ionização da molécula e conseqüentemente, a diminuição na retenção destes compostos.

De acordo com essa teoria a ordem de eluição encontrada para os antidepressivos em estudo está condizente com os valores de k obtidos para esses antidepressivos, visto que se trata de bases fracas, segundo valores de p_{ka}s dos fármacos.

Tabela II.4. Resolução cromatográfica (R) para as diferentes fases móveis avaliadas.

<div style="display: inline-block; transform: rotate(-45deg); transform-origin: left top; white-space: nowrap;">Fármacos</div> <div style="display: inline-block; transform: rotate(45deg); transform-origin: right top; white-space: nowrap;">Fases</div>	R								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Mirtazapina	1,34	0,91	1,61	1,53	1,04	1,22	—	1,06	3,03
Citalopram	1,71	1,60	2,51	2,17	—	2,52	—	—	4,21
Paroxetina	—	—	—	—	—	—	—	—	2,67
Imipramina	0,19	1,77	0,15	0,97	0,6	2,17	0,32	—	3,99
Fluoxetina	0,08	—	0,66	0,49	0,15	0,56	—	—	1,33
Amitriptilina	0,28	—	0,843	0,74	1,08	1,83	—	0,65	2,23
Sertralina	1,81	1,73	1,68	0,71	1,03	1,75	1,19	1,39	2,58
Clomipramina	1,50	1,51	1,67	1,85	1,03	9,6	1,19	1,33	2,06

(—) Co-eluição do fármaco.

A ordem de eluição dos fármacos foi determinada por injeções individuais dos padrões e seus respectivos tempos de retenção são ilustrados na Tabela II.5. Para a resolução cromatográfica dos fármacos, uma solução contendo a mistura da solução padrão de todos os antidepressivos na mesma concentração foi injetada em triplicata, o cromatograma resultante é ilustrado na Figura II.7.

Tabela II.5. Ordem de eluição dos antidepressivos e seus respectivos tempos de retenção.

ANTIDEPRESSIVOS	TEMPOS DE RETENÇÃO (min)
Mirtazapina	8,7
Citalopram	10,7
Paroxetina	14,2
Imipramina	17,0
Amitriptilina	18,4
Fluoxetina	19,7
Sertralina	24,6
Clomipramina	27,5

Figura II.7. Cromatograma referente à análise da solução padrão dos antidepressivos (500 ng mL^{-1}). Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV $\lambda = 230 \text{ nm}$.

Para se obter sensibilidade analítica adequada à análise dos antidepressivos em níveis terapêuticos, a resposta do detector ultravioleta foi também avaliada. Conforme resultados obtidos, o comprimento de onda de 230 nm apresentou sensibilidade analítica

adequada para a maioria dos antidepressivos, após processo de extração, utilizando 1 mL de plasma como amostra.

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

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

O volume da amostra, a velocidade de agitação e a espessura do revestimento do polímero influenciam o tempo de equilíbrio de extração ¹⁶, assim sendo, para a otimização do equilíbrio de sorção SBSE, essas variáveis foram mantidas constantes.

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

II.4.2.1 Otimização do tempo e da temperatura de extração

O aumento da temperatura favorece o processo de difusão dos solutos da matriz aquosa para a fase polimérica (PDMS), resultando em menor tempo de extração, no entanto, pode diminuir a constante de distribuição do fármaco entre o revestimento PDMS e fase aquosa ³⁶. Dessa forma, encontrar a melhor temperatura, para um menor tempo de análise e sensibilidade analítica adequada é de extrema importância quando se utiliza a técnica **SBSE**.

Nesse estudo as variáveis tempo (15 a 60 minutos) e temperatura (38 a 70°C) de extração foram otimizadas concomitantemente (Figuras II.8 a II.15), almejando avaliar de forma mais adequada a influência dessas variáveis no processo SBSE. Segundo as curvas obtidas, as extrações realizadas em 45 minutos a 50°C apresentaram maior sensibilidade analítica para todos os antidepressivos avaliados. De acordo com os resultados obtidos, o aumento da temperatura de 38°C para 50°C aumentou consideravelmente a sensibilidade analítica para todos os fármacos, porém a continuidade desse aumento gradual na temperatura de 50°C para 60°C e posteriormente para 70°C não apresentou o mesmo comportamento. O aumento na temperatura para 70°C resultou em extrações menos eficientes para todos os antidepressivos em estudo.

Figura II.8. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para a sertralina. Amostra de plasma enriquecido com os antidepressivos (500 ng mL⁻¹) diluída com solução tampão borato 0,05 mol L⁻¹ pH 9,0. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV $\lambda = 230$ nm.

Figura II.9. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para o citalopram. Amostra de plasma enriquecido com os antidepressivos (500 ng mL^{-1}) diluída com solução tampão borato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 9,0. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV $\lambda=230 \text{ nm}$.

Figura II.10. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para a clomipramina. Amostra de plasma enriquecido com os antidepressivos (500 ng mL^{-1}) diluída com solução tampão borato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 9,0. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV $\lambda=230 \text{ nm}$.

Figura II.11. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para imipramina. Amostra de plasma enriquecido com os antidepressivos (500 ng mL^{-1}) diluída com solução tampão borato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 9,0. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV $\lambda = 230 \text{ nm}$.

Figura II.12. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para a mirtazapina.: Amostra de plasma enriquecido com os antidepressivos (500 ng mL^{-1}) diluída com solução tampão borato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 9,0. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV $\lambda = 230 \text{ nm}$.

Figura II.13. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para a paroxetina. Amostra de plasma enriquecido com os antidepressivos (500 ng mL⁻¹) diluída com solução tampão borato 0,05 mol L⁻¹ pH 9,0. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV $\lambda = 230$ nm.

Figura II.14. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para a amitriptilina. Amostra de plasma enriquecido com os antidepressivos (500 ng mL⁻¹) diluída com solução tampão borato 0,05 mol L⁻¹ pH 9,0. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV $\lambda = 230$ nm.

Figura II.15. Avaliação do tempo e temperatura na eficiência do processo SBSE para a fluoxetina. Amostra de plasma enriquecido com os antidepressivos (500 ng mL^{-1}) diluída com solução tampão borato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 9,0. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV $\lambda = 230 \text{ nm}$.

Temperaturas superiores a 70°C não foram avaliadas para conservar a integridade físico-química das amostras. Na temperatura de 38°C , o equilíbrio de sorção não foi atingido no intervalo de tempo avaliado.

O tempo de equilíbrio aumenta drasticamente com aumento do volume de amostra e o volume da fase extratora (PDMS).

A influência do $K_{o/w}$, o volume de amostra e o volume de fase extratora no tempo de extração foram estudados por Bicchi e colaboradores ¹¹, empregando como modelo três pesticidas (metilparation, β -endossulfan e buprofezan). Os resultados obtidos pelos autores indicaram que para baixo volume de amostra empregando fases extradoras com 20, 40 e $110 \mu\text{L}$ de PDMS obteve-se boa correlação entre

os valores estimados pelos valores de $K_{o/w}$. Já com grandes volumes de amostra, 1L e 5L, essa correlação não foi observada. Para pequenos volumes de amostra (100mL) o equilíbrio de sorção foi atingido em 6 h; já para amostras de 1L, o equilíbrio não foi observado após 24 h de extração.

Stopforth e colaboradores ²⁴ observaram que o aumento da temperatura acima de 50°C nas análises de 4-hidroxinonenal em amostras de urina reduziu a eficiência de extração e aumentou o tempo de análise.

Stopforth e colaboradores ²⁵, quantificando testosterona e epitestosterona em pacientes HIV positivos, também observaram comportamento similar com relação ao aumento gradual da temperatura. Empregando temperaturas acima de 50°C, os autores observaram a redução nas áreas dos picos para a epitestosterona e um aumento insignificante para a testosterona.

II.4.2.2 Influência da força iônica

O efeito da adição de sal (força iônica) na matriz aquosa foi também avaliado. A adição de sal exibe efeitos opostos sobre os solutos em solução. Com a adição de sal em solução aquosa, as moléculas de água tendem a formar uma esfera de hidratação ao redor dos íons do sal, reduzindo a disponibilidade de moléculas de água livres para dissolver os solutos ³⁸. Dessa forma, a atividade ou a concentração efetiva do soluto em solução aumenta a eficiência do processo SBSE. Para solutos na forma não dissociada o efeito “salting out” é esperado. Em contrapartida, com o aumento da força iônica, os íons do sal adicionado podem interagir com o soluto em solução por meio de interações eletrostáticas, covalentes ou par iônico ³⁸⁻³⁹, diminuindo a

difusão do soluto para a fase extratora. Na Figura II.16, observa-se o efeito da adição de sal na matriz aquosa para extração dos antidepressivos em amostras de plasma.

Figura II.16. Efeito da adição de sal à matriz no processo SBSE para a análise de antidepressivos em amostras de plasma. Amostra enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV $\lambda = 230$ nm.

De acordo com a Figura II.16, para a maioria dos fármacos, a adição de sal diminuiu a eficiência do processo SBSE, exceto para a fluoxetina e para a mirtazapina, as quais exibiram ligeiro aumento nas taxas de extração com a adição de 5% de NaCl à amostra.

Almeida e Nogueira ³² relataram em seu trabalho que adições de NaCl superiores a 15% pode danificar a fase extratora PDMS. Acima dessa concentração, ocorre a saturação da solução e moléculas de sal podem ser adsorvidas na superfície do revestimento de PDMS, diminuindo, dessa forma, a eficiência do processo de extração.

Altas concentrações de sal podem também aumentar a viscosidade do meio, diminuindo, portanto, a velocidade de difusão do soluto da amostra para a fase extratora ⁴⁰.

II.4.2.3 Influência do pH da matriz

Para fármacos que apresentam grupos ionizáveis, o pH da matriz aquosa é um parâmetro relevante na otimização do processo SBSE. O revestimento de polidimetilsiloxano (PDMS) extrai preferencialmente solutos não iônicos ³⁴. O ajuste do pH da matriz biológica, em valores nos quais, os fármacos encontram-se, na sua maior parte na forma não dissociada, resulta em extrações SBSE mais eficientes.

O efeito do pH da matriz biológica na eficiência de extração pode ser observado na Figura II.17. Os valores de pH 8,0, 9,0, 10,0 e 11,0 foram selecionados de acordo com a faixa de pka dos fármacos analisados.

Segundo a Figura II.17, a maioria dos antidepressivos analisados apresentou sensibilidade analítica satisfatória em solução tampão pH 9,0. Nesse valor de pH é possível também evitar a degradação da fase extratora, aumentando, portanto a vida útil da barra SBSE.

Figura II.17. Influência do pH da matriz na eficiência do processo SBSE. AMI- amitriptilina, PAR- paroxetina, IMI- imipramina, SER- sertralina, CIT- citalopram, FLU- fluoxetina, MIR- mirtazapina e CLO- clomipramina. Amostra enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV $\lambda = 230$ nm.

II.4.2.4 Dessorção

O tempo de dessorção foi também otimizado, os princípios teóricos que regem o processo de dessorção do soluto na fase extratora são os mesmos já descritos para o processo de sorção. O tempo e a temperatura de dessorção adequados são aqueles, nos quais não se observa a presença de solutos no cromatograma após o processo de dessorção, eliminando, dessa forma, o “carryover” favorecendo a repetitividade dos resultados. O efeito do tempo de dessorção no processo SBSE é ilustrado na Figura II.18.

Figura II.18. Influência do processo de dessorção na eficiência do processo SBSE. Área do pico do antidepressivo em função do tempo de dessorção SBSE. AMI- amitriptilina, PAR- paroxetina, IMI- imipramina, SER- sertralina, CIT- citalopram, FLU- fluoxetina, MIR- mirtazapina e CLO- clomipramina. Amostra enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL^{-1} e diluída em 4 mL de solução tampão borato pH 9,0. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV $\lambda = 230 \text{ nm}$.

Os fármacos apresentaram eficiente processo de dessorção SBSE em acetonitrila após 15 minutos, a 50°C , com exceção dos fármacos: amitriptilina e citalopram, cujo equilíbrio de dessorção não foi atingido no intervalo de tempo avaliado. No entanto, nessas condições de dessorção, o processo SBSE apresentou sensibilidade analítica satisfatória para todos os antidepressivos avaliados. Dessa forma, o tempo de dessorção de 15 minutos foi selecionado para as análises posteriores. Uma etapa de limpeza da barra extratora PDMS em metanol a 50°C por 15 minutos foi realizada entre as extrações.

Nesse procedimento de dessorção não foi viável avaliar a fase móvel como solvente de dessorção, devido à necessidade de um volume relativamente alto de solvente de dessorção (1,5 mL). Acetonitrila e metanol por serem relativamente voláteis permitiram a evaporação do solvente e ressuspensão dos solutos em fase móvel, antecedendo a injeção destes no sistema cromatográfico. A acetonitrila propiciou melhor estabilidade na linha de base do cromatograma resultante, além de sensibilidade analítica satisfatória para os antidepressivos.

Alternativamente, os solutos podem ser dessorvidos em banho de ultra-som, empregando menor volume de solvente de dessorção. Porém, para os antidepressivos avaliados com a dessorção dos solutos em fase móvel (500 µL) durante 30 minutos em banho de ultra-som, o método não apresentou sensibilidade analítica adequada.

Segundo Sandra e colaboradores ³⁷, as extrações **SBSE** podem ser realizadas fora do equilíbrio de sorção, desde que os valores das variáveis SBSE sejam rigorosamente controlados durante as extrações. No entanto, nesse trabalho as variáveis **SBSE** foram otimizadas, para se obter sensibilidade analítica adequada às análises de antidepressivos no intervalo terapêutico.

II.4.2.5 Condições Otimizadas

No **Quadro II.1** encontram-se os resultados obtidos no processo de otimização, em que se obteve a maior sensibilidade analítica para a maioria dos antidepressivos, assim como a maior repetitividade dos resultados com a mesma fibra.

Quadro II.1.**Condições SBSE otimizadas**

- ✓ pH da amostra = 9,0;
- ✓ diluição da amostra = 4mL de solução tampão borato 0,25 mol L⁻¹;
- ✓ modo de extração = direta;
- ✓ temperatura de extração = 50°C;
- ✓ tempo de extração = 45 minutos;
- ✓ força iônica = sem adição de NaCl;
- ✓ solvente de dessorção = acetonitrila;
- ✓ modo de dessorção = direta;
- ✓ tempo de dessorção = 15 minutos;
- ✓ Temperature de dessorção = 50°C.

II.4.3 Validação analítica

Os métodos analíticos empregados para quantificação de fármacos e seus produtos de biotransformação têm sido empregados para diferentes fins, tais como, monitorização terapêutica, estudos de biodisponibilidade e toxicocinética ⁴².

A validação analítica do método padronizado tem sido realizada para assegurar a confiabilidade dos resultados apresentados.

No Brasil, as agências normativas que estabelecem critérios para a validação analítica têm sido a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) e o Ministério da Agricultura ⁴³. Nesse trabalho foram adotadas as normas de validação analítica estabelecidas pela ANVISA.

II.4.3.1 Seletividade do método SBSE/LC-UV

Segundo a ANVISA, na resolução RE nº 899, a seletividade de um método é a capacidade de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e compostos endógenos da matriz biológica ³⁴.

A seletividade do método **SBSE/LC-UV** é demonstrada por meio dos cromatogramas do plasma branco de referência enriquecido com antidepressivo, e plasma branco de referência apresentados nas Figuras II.19 e II. 20, respectivamente. Algumas amostras adicionais de plasma (branco de referência) foram também avaliadas. Nessas amostras, o sinal analítico (área) dos interferentes no tempo de retenção dos antidepressivos foi inferior a 20% do sinal cromatográfico desses fármacos em concentrações correspondentes ao limite de quantificação.

Figura II.19. Cromatograma referente à análise SBSE/LC-UV da amostra de plasma branco de referência enriquecido com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹. Condições SBSE: 4 mL de solução tampão borato pH 9,0, 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em acetonitrila 50°C, 15 minutos. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV $\lambda = 230$ nm.

Figura II.20. Cromatograma referente à análise SBSE/LC-UV da amostra de plasma branco de referência. Condições SBSE: 4 mL de solução tampão borato pH 9,0, 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em acetonitrila 50°C, 15 minutos Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV $\lambda = 230$ nm.

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 solutos, injetadas individualmente nas mesmas condições cromatográficas. Os espectros (absorbância *versus* comprimento de onda) na região do ultravioleta (UV) também foram considerados (Anexo 1).

Os antidepressivos podem ser prescritos em combinação com diferentes agentes psicotrópicos e/ou outros fármacos, portanto é importante avaliar prováveis interferentes como os compostos suscetíveis a co-administração (Tabela II.6). Entre os fármacos avaliados, a desipramina coeluiu com a paroxetina, porém esse tipo de combinação de dois antidepressivos na prática clínica é extremamente indesejada ⁴⁴. Outro provável interferente, o diazepam, também coeluiu com a imipramina nas condições cromatográficas empregadas. Tentando reverter os erros que essas coeluições podem acarretar em análises de rotina, modificações da fase móvel foram avaliadas, sendo a seguinte fase móvel sugerida para análise de pacientes que fazem uso terapêutico desses fármacos: tampão acetato de sódio 0,25 mol L⁻¹, pH 4,50, acetonitrila e metanol (65:30:5, v/v/v) com fluxo de 1 mL min⁻¹.

Tabela II.6. Tempo de retenção dos fármacos avaliados como possíveis interferentes.

Fármacos	Tempo de retenção (min)
Cafeína	2,93
Metoprolol	4,05
Moclobemida	4,83
Etidocaína	7,78
Carbamazepina	8,41
Sulfametazaxol	8,43
Mirtazapina	8,67
Propanolol	8,90
Lorazepam	9,75
Citalopram	10,65
Despramina	13,78
Paroxetina	14,24
Nortriptilina	15,21
Duloxetina	15,81
Diazepam	16,07
Imipramina	16,96
Diclofenaco	17,78
Amitriptilina	18,38
Fluoxetina	19,71
Levomepromazina	21,89
Sertralina	24,62
Clomipramina	27,55
Haloperidol	nd*
Indometacin	nd
Metildopa	nd
Amiodarona	nd
Clonazepam	nd
Fenobarbital	nd
Primidona	nd
Indometacin	nd
Furosemida	nd
Cimetidina	nd
Ranitidina	nd

* **nd:** não detectado nas condições avaliadas.

II.4.3.2 Linearidade

Para avaliar a capacidade do método proposto em responder proporcionalmente à concentração do soluto, curvas analíticas foram traçadas.

A linearidade do método padronizado (**SBSE/LC-UV**) foi determinada utilizando-se amostras de plasma (branco de referência) enriquecidos com os fármacos nas concentrações de 50, 100, 300, 500 e 1000 ng mL⁻¹. Os intervalos avaliados apresentaram-se lineares com coeficientes de correlação maiores que 0,99 (Tabela II.7) e os coeficientes de variação dos pontos da curva de calibração foram menores que 15%, conforme preconiza a ANVISA. As curvas podem ser observados no Anexo 2.

Tabela II.7. Linearidade e limite de quantificação do método SBSE/LC desenvolvido.

Fármacos	Regressão linear (LOQ-1000 ng mL⁻¹)	r²	LOQ (ng mL⁻¹)
Paroxetina	y = - 15828,7 + 1185,4 x (15,0-1000,0 ng mL ⁻¹)	0,997	15,0
Citalopram	y = 4169,4 + 62,2 x (20,0-1000,0 ng mL ⁻¹)	0,998	20,0
Mirtazapina	y = 15271,3 + 1194,9 x (10,0-1000,0 ng mL ⁻¹)	0,995	10,0
Fluoxetina	y = 7540,4 + 1089,5 x (10,0-1000,0 ng mL ⁻¹)	0,999	10,0
Sertralina	y = 1373,4 + 3,6 x (20,0-1000,0 ng mL ⁻¹)	0,997	20,0
Imipramina	y = 2734,3 + 5,7 x (20,0-1000,0 ng mL ⁻¹)	0,997	20,0
Amitriptilina	y = 2328,9 + 10,26 x (20,0-1000,0 ng mL ⁻¹)	0,995	20,0

II.4.3.3 Limite de Quantificação (LOQ)

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

O cromatograma obtido nas condições do limite de quantificação pode ser observado na Figura II.21.

Figura II.21. Cromatograma referente à análise SBSE/LC-UV da amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos nas concentrações do limite de quantificação fluoxetina. Amostra diluída em solução tampão borato pH 9,0, 50°C durante 45 minutos. Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v). Coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV λ = 230 nm.

Segundo a ANVISA, valores de coeficientes de variação inferiores ou iguais a 20% para o limite de quantificação são aceitáveis. Para os antidepressivos avaliados nesse estudo, o limite de quantificação variou de 10 - 20 ng mL⁻¹ com coeficientes de variação inferiores a 15% (Tabela II.8).

Tabela II. 8. Precisão inter ensaios, exatidão e recuperação absoluta do método SBSE/LC-UV.

Fármacos	Concentração adicionada (ng mL⁻¹)	Precisão inter ensaio (%)	Exatidão (%)	Recuperação (%)
Paroxetina	50,0	14,2	96	52
	300,0	12,1	102	60
	500,0	2,6	100	69
Citalopram	50,0	13,0	98	92
	200,0	3,5	99	84
	500,0	4,3	96	97
Mirtazapina	50,0	8,4	96	57
	300,0	4,9	97	86
	500,0	7,4	97	97
Fluoxetina	50,0	6,5	96	77
	300,0	13,2	97	79
	500,0	2,7	99	90
Sertralina	50,0	9,1	95	95
	300,0	4,9	98	103
	500,0	3,5	101	100
Imipramina	50,0	12,1	93	98
	300,0	7,3	101	105
	500,0	7,8	103	100
Amitriptilina	50,0	8,8	91	91
	300,0	6,1	101	100
	500,0	9,4	99	110

(n = 5)

II.4.3.4 Recuperação relativa, exatidão e precisão inter ensaio

A recuperação representa a estimativa direta da capacidade do método em extrair o soluto de interesse. As variações entre os resultados de diferentes análises representam o coeficiente de variação geralmente expresso em %.

Para cálculo da recuperação relativa foram consideradas as razões entre as áreas dos fármacos e do padrão interno, dessa forma, possíveis erros puderam ser minimizados ou extintos. A recuperação foi calculada pela comparação direta das razões das áreas obtidas após determinações **SBSE/LC-UV**.

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

Na Tabela II.8 encontram-se os valores de recuperação absoluta e precisão inter ensaio e exatidão dos antidepressivos para as análises SBSE/LC-UV em amostras de plasma enriquecido em três níveis de concentração, baixo, médio e alto; para cada concentração, os testes foram realizados em replicada.

No processo **SBSE**, a influência das proteínas foi minimizada, por meio da diluição de amostras de plasma com solução tampão borato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 9,0; dessa forma, taxas de recuperação analítica próximas a 100% foram obtidas. O processo de diluição das amostras de plasma com solução tampão diminuiu a viscosidade da matriz, favorecendo a difusão dos fármacos para a fase extratora, assim como diminuiu o tempo necessário para atingir o equilíbrio de partição. A fase PDMS extrai solutos não-iônicos. A diluição das amostras de plasma com solução tampão permitiu o ajuste do pH da matriz, favorecendo a

supressão da ionização dos fármacos (valores de pK_a de 8,7 a 10,2), aumentando assim, a afinidade destes com a fase extratora de PDMS.

Segundo Tienpont e colaboradores ²⁴, a venlafaxina, um antidepressivo pertencente à classe dos inibidores seletivos da recaptção de serotonina e noradrenalina, apresentou alto índice de recuperação (87%) devido a sua considerável afinidade com a fase extratora de PDMS. Esse exemplo mostra que a recuperação é altamente dependente da polaridade dos solutos, podendo ser modificada com derivatização do soluto anteriormente ao processo de extração.

Os valores de recuperação obtidos neste trabalho estão de acordo com a literatura ^{11, 24, 25, 31, 44}.

Conforme as normas da ANVISA, valores de exatidão entre 80 e 120% são desejáveis ³⁴. O método padronizado apresentou valores de precisão inter ensaios de 95 a 103% com coeficientes de variação inferiores a 15% (Tabela II.8).

II.4.4 Aplicabilidade do método SBSE/LC-UV

Segundo os parâmetros de validação, o método **SBSE/LC-UV** é adequado para análises de antidepressivos em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica, apresentando repetitividade, limite de quantificação, linearidade e especificidade de acordo com os valores preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Para avaliar a aplicabilidade do método **SBSE/LC-UV** padronizado ao uso clínico, amostras de plasma de pacientes idosos em terapia com

os antidepressivos foram analisadas, utilizando as condições otimizadas.

Os cromatogramas **SBSE/LC-UV** referentes às análises dessas amostras são apresentados nas Figuras II.22 A, II.22B e II.22 C.

As concentrações encontradas nessas amostras foram: 191,0 ng mL⁻¹ para a Fluoxetina (Figura II.22.A), 43,8 ng mL⁻¹ para a paroxetina (Figura II.22.B) e 225,2 ng mL⁻¹ para a sertralina (Figura II.22.C). Essas amostras foram coletadas de pacientes idosos em terapia com Prozac® (40 mg/dia), Aropax® (40 mg/dia) e Zoloft® (150 mg/dia), respectivamente.

Figura II.22 A. Cromatograma referente à análise SBSE / LC - UV da amostra de plasma de paciente em terapia com o antidepressivo fluoxetina. Condições SBSE: 4 mL de solução tampão borato pH 9,0, 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em acetonitrila 50°C, 15 minutos Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV $\lambda = 230$ nm.

Figura II.22 B. Cromatograma referente à análise SBSE / LC - UV da amostra de plasma de paciente em terapia com o antidepressivo paroxetina. Condições SBSE: 4 mL de solução tampão borato pH 9,0, 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em acetonitrila 50°C, 15 minutos Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v) coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV $\lambda = 230$ nm.

Figura II.22 C. Cromatograma referente à análise SBSE/LC da amostra de plasma de paciente em terapia com o antidepressivo sertralina. Condições SBSE: 4 mL de solução tampão borato pH 9,0, 50°C durante 45 minutos; dessorção direta em acetonitrila 50°C, 15 minutos Condições cromatográficas: solução tampão acetato pH 4,5, 0,25 mol L⁻¹, acetonitrila e metanol nas proporções 60: 37: 3 (v/v/v). Coluna C18 Lichrospher RP-select B, detector UV $\lambda = 230$ nm.

II.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A otimização das variáveis **SBSE** permitiu o desenvolvimento do método **SBSE/LC-UV**, o qual apresentou sensibilidade analítica adequada para a análise dos antidepressivos em níveis terapêuticos.

Segundo a validação analítica do método **SBSE/LC-UV**, realizada em diferentes concentrações plasmáticas, considerando o intervalo terapêutico dos fármacos, o método padronizado, para a análise simultânea dos antidepressivos: mirtazapina, citalopram, paroxetina, imipramina, amitriptilina, fluoxetina, sertralina e clomipramina em amostras de plasma, apresentou seletividade, precisão inter ensaios com coeficientes de variação menores que 15%, recuperação absoluta na faixa de 76% a 100,2%, linearidade de intervalos terapêuticos a tóxicos (de 50 a 1000 ng mL⁻¹) e limite de quantificação adequado. Dessa forma, podemos assegurar que a metodologia padronizada apresenta sensibilidade, repetitividade e exatidão adequadas para fins de monitorização terapêutica de antidepressivos tricíclicos e não-tricíclicos.

O método **SBSE/LC-UV** também poderá ser empregado na avaliação de níveis plasmáticos, em análises toxicológicas de urgência; após administração acidental de elevadas doses ou em casos de suicídios.

Dessa forma, a técnica **SBSE** destaca-se como uma alternativa promissora para a substituição das técnicas convencionais. No entanto, o revestimento de polidimetilsiloxano é a única fase extratora disponível no comércio, o que limita a seletividade/especificidade do processo de extração. Assim, é necessário o desenvolvimento de novas fases extratoras (SBSE) mais seletivas e de baixo custo.

II.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; JANSSEN, H. G.; CRAMERS, C. A.; Study into equilibrium mechanism between water and poly(dimethylsiloxane) for very apolar solutes: adsorption or sorption? *Analytical Chemistry*, v. 71, p. 5213 – 5216, 1999.
2. MELO, L. P.; NOGUEIRA, A. M.; LANÇAS, F. M.; QUEIROZ, M. E. C. Polydimethylsiloxane/polypyrrole stir bar sorptive extraction and liquid chromatography (SBSE/LC-UV) analysis of antidepressants in plasma samples. *Journal of Chromatography B*, submetido à publicação.
3. KAWAGUCHI, M.; ITO, R.; SAITO, K.; NAKAZAWA H. Novel stir bar extraction methods for environmental and biomedical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 40, p. 500 – 508, 2006.
4. DAVID, F.; SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction for trace analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 1152, n. 1 - 2, p. 54 – 69, 2007.
5. BALTUSSEN, E.; CRAMERS, C. A.; SANDRA, P. J. F. Sorptive sample preparation – a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 373, p. 3 – 22, 2002.
6. PAWLISZYN, J. *Applications of solid phase microextraction*; Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999; p. 45.
7. PAWLISZYN, J. Theory of solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography Science*, v. 38, n. 7, p. 270 – 278, 2000.
8. BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; JANSSEN, H. –G.; CRAMERS, C. A. Study into the Equilibrium Mechanism between Water and Poly(dimethylsiloxane) for Very Apolar Solutes: Adsorption or Sorption? *Analytical Chemistry*, v. 71, p. 5213 – 5216, 1999.

9. BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; CRAMERS, C. A. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. *Journal of Microcolumn Separations*, v. 11, p. 737 – 747, 1999.
10. LAMBERT, J. P.; MOLLET, W. M.; KWONG, E.; LUBDA, D. Stir bar sorptive extraction based on restricted access material for the direct extraction of caffeine and metabolites in biological fluids. *Journal of Chromatography A*, v. 1075, p. 43 – 49, 2005.
11. BICCHI, C.; CORDERO, C.; RUBIOLO, P.; SANDRA, P. Impact of water/PDMS phase ratio, volume of PDMS, and sampling time on Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) recovery of some pesticides with different $K_{O/W}$ *Journal of Separation Science*, v. 26, p. 1650-1656, 2003.
12. LIU, W.; WANG, H.; GUAN, Y. Preparation of stir bars for extraction using sol-gel techniques. *Journal of Chromatography A*, v. 1045, p. 15 – 22, 2004.
13. XIAOLAN, Z.; CAI, J.; JUN, Y.; SU, Q.; YUN, G. Films coated with imprinted polymers for the selective stir bar sorption extraction of monocrotophos. *Journal of Chromatography A*, v. 1131, p. 37 – 44, 2006.
14. BICCHI, C.; CORDERO, C.; LIBERTO, E.; RUBIOLO, P.; SGORBINI, B.; DAVID, F.; SANDRA, P. Dual – phase twistors: A new approach to headspace sorptive extraction and stir bar sorptive extraction. *Journal of Chromatography A*, v. 109, n. 1- 2, p. 9 – 16, 2005.
15. COENSEL, N.; DESMET, K.; GORECKI, T.; SANDREA, P. Determination of polydimethylsiloxane partition coefficients using

headspace sorptive extraction. *Journal of Chromatography A*, v. 1150, p. 183 - 189, 2007.

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

17. Gerstel home page (Global Analytical Solutions): http://www.gerstel.com/product_twister_stir_bar_sorptive_extraction_sbse.htm. Acessado em 08 de março de 2008. Twister products.

18. KAWAGUCHI, M.; ISHII, Y.; OKANOUCI, N.; ITO, R.; INOUE, K.; SAITO, K.; NAKAZAWA, H. Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry in the multi-shot mode for determination of estrogens in river water samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1049, p. 1 - 8, 2004.

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

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

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

22. KAWAGUCHI, M.; INOUE, K.; YOSHIMURA, M.; SAKUI, N.; OKANOUCI, N.; ITO, R.; YOSHIMURA, Y.; NAKAZAWA, H. Trace analysis of phenolic xenoestrogens in water samples by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1041, p. 19 – 26, 2004.
23. KAWAGUCHI, M.; KINOUE, N.; SAKUI, R.; ITO, S.; IZUMI, T.; MAKINO, N.; OKANOUCI, N.; NAKAZAWA, H. Stir bar sorptive extraction and thermal desorption – gas chromatography – mass spectrometry for measurement of 4 – nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human biological samples. *Journal of Chromatography B*, v. 799, p. 119 – 125, 2004.
24. TIEPONT, B.; DAVID, F.; BENJITS, T.; SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction – thermal desorption – capillary CG-MS for profiling and target compounds analysis of pharmaceutical drugs in urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 32, p. 569 – 579, 2003.
25. STOPFORTH, A.; BURGER, B. V.; CROUCH, A. M.; SANDRA, P. Urinalysis of 4- hidroxyononenal, a marker of oxidative stress, using stir bar sortive extraction-thermal desorption-gas chromatography/ mass spectrometry. *Journal of Chromatrography B*, v. 834, p. 134-140, 2006.
26. STOPFORTH, A.; GROBBELAAR, J. C.; CROUCH, A. M.; SANDRA, P. Quantification of testosterone and epitestosterone in human urine samples by stir bar sorptive extraction- thermal desorption-gas chromatography/ mass spectrometry: Application to HIV- positive urine samples. *Journal of Separation Science*, v. 30, p. 257-265, 2007.
27. NENG, N. R.; CORDEIRO, C. A. A.; FREIRE, A. P.; NOGUEIRA, J. M. F. Determination of glyoxal and methylglyoxal in environmental and

biological matrices by stir bar sorptive extraction with *in-situ* derivatization. *Journal of Chromatography A*, v. 1169, p. 47 – 52, 2007.

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

29. KAWAGUCHI, M.; YOSHIMURA, K.; ITO, R.; SAKUI, N.; OKANOUCHI, N.; NAKAZAWA, H. Determination of bisphenol A in river water and body fluids samples by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption- gás chromatograph- mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 805, p. 41 -48, 2004.

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

31. KAWAGUCHI, M.; ISHII,Y.; OKANOUCHI, N.; ITO, R.; SAITO, K.; NAKAZAWA, H. Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption – gas chromatography – mass spectrometry for determination of chlorophenols in water and body fluid samples. *Analytical Chimica Acta*, v. 533, p. 57 – 65, 2005.

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

33. Legislação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em 02 de fevereiro de 2008. Resolução RE nº 899, "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos", publicado no D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 02 de junho de 2003.
34. LANÇAS, F. M. *Cromatografia em fase gasosa*. São Carlos, SP, Acta, p. 254, 1993.
35. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas, SP, Unicamp, p. 331, 2006.
36. SANDRA, P.; TIENPONT, B.; VERCAMMEN, J.; TREDoux, A.; SANDRA, T.; DAVID, D. Stir bar sorptive extraction applied to the determination of dicarboximide fungicides in wine. *Journal of Chromatography A*, v. 928, p. 117 – 126, 2001.
37. PAWLISZYN, J. *Solid Phase Microextraction: Theory and practice*. Wiley-VCH Inc, New York, USA, 1997, p. 53.
38. WALLS, M.; MULLETT, W. M.; PAWLISZYN, Monitoring of drugs and metabolites in whole blood by restricted-access solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1025, p. 85 – 92, 2004.
39. WALLS, M.; MULLETT, W. M.; PAWLISZYN, Monitoring of drugs and metabolites in whole blood by restricted-access solid phase microextraction coupled to liquid chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1025, p. 85 – 92, 2004.
40. LEE, M. R.; YEH, Y. C.; HSIANG, W. S.; CHEN, C. C., Application of solid- phase microextraction and gas chromatography mass

spectrometry for determination of chlorophenols in urine. *Journal of Chromatography B*, v. 707, p. 91-97, 1997.

41. CHASIN, A. M.; CHASIN, M.; SALVADOR, M.C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. *Ver. Farm. Bioquím.*, Univ. S. Paulo, v. 30, nº 2, p. 49-53, 1994.

42. RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, São Paulo, SP, v. 27, n. 5, p. 771 - 780, 2004.

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

44. POPP, P.; BAUER, C.; WENNRICH, L. Application of stir bar sorptive extraction in combination with column liquid chromatography for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Analytica Chimica Acta*, v. 436, p. 1 - 9, 2003.

CAPÍTULO III

III. 1. INTRODUÇÃO

III.1.1 Microextração em Fase Sólida (SPME)

III.1.1.1 Princípios Teóricos da SPME

A microextração em fase sólida (**SPME**), introduzida por Pawliszyn e colaboradores em 1990, é uma técnica de preparo de amostra não exaustiva que o volume da fase extratora é consideravelmente menor em relação ao volume da amostra ¹. Esta técnica apresenta uma série de vantagens quando comparada às técnicas de extração convencionais, líquido-líquido e extração em fase sólida; não requer instrumentação analítica sofisticada, não utiliza solvente orgânico em determinações por cromatografia gasosa (**GC**), ou pequena quantidade de solvente orgânico em determinações por cromatografia líquida (**LC**), rápido processo operacional, permite a automação das análises, a reutilização das fibras extratoras, e integra em um único sistema a extração, a concentração e a introdução da amostra no sistema cromatográfico ^{2,3}. Para as determinações SPME, tem sido utilizado 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 III.1 e III.2.

A SPME é baseada no equilíbrio de partição do soluto entre as fases: aquosa (amostra homogênea), polimérica extratora (fibra) e gasosa ²⁻⁵. A concentração do soluto nas fases, polimérica e aquosa, está relacionada à sua solubilidade nesses diferentes meios, já na fase gasosa, à volatilidade do soluto e ao volume do “headspace” do frasco extrator. Durante a extração em um sistema trifásico considerado ideal, os compostos migram entre as três fases até que o equilíbrio de partição seja atingido ¹.

Figura III.1. 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 ⁶.

Figura III.2. 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: Êmbolo⁶.

De acordo com a lei da conservação das massas, a quantidade de soluto presente na amostra inicial é igual à somatória das quantidades

individuais do soluto nas diferentes fases do sistema após ter atingido o equilíbrio de partição (Equação 1) ²⁻⁵.

$$n_0 = n_{seq} + n_{exeq} + n_{heq}$$

Equação 1

Em que:

n_0 é o número de mols inicial do soluto na amostra;

n_s é o número de mols do soluto presente na fase líquida homogênea após ter atingido o equilíbrio de partição;

n_h é o número de mols do soluto presente na fase gasosa do sistema após ter atingido o equilíbrio de partição e

n_{ex} é o número de mols do analito presente na fase extratora após ter atingido o equilíbrio de partição.

A concentração do soluto após ter sido atingido o equilíbrio de partição pode ser expressa por meio da seguinte expressão matemática (Equação 2):

$$C_0 V_s = C_{ex}^{\infty} \cdot V_{ex} + C_s^{\infty} \cdot V_s + C_h^{\infty} V_h \quad \textbf{Equação 2}$$

Em que:

C_0 é a concentração inicial do soluto na amostra;

V_s é o volume da amostra;

C_{ex}^{∞} é a concentração do soluto na fase extratora no equilíbrio após ter atingido o equilíbrio de partição;

C_h^∞ é a concentração do soluto em fase gasosa após ter atingido o equilíbrio de partição;

V_h é o volume da fase gasosa;

V_o é o volume da fase extratora e

C_s^∞ é a concentração do soluto na amostra após ter atingido o equilíbrio de partição.

Se as constantes de partição do soluto entre as fases polimérica / gasosa (K_{hex}) e gasosa / aquosa (K_{hs}) forem definidas como:

$$K_{hex} = \frac{C_{ex}^\infty}{C_h^\infty} \quad \textbf{Equação 3}$$

$$K_{hs} = \frac{C_h^\infty}{C_s^\infty} \quad \textbf{Equação 4}$$

Com o rearranjo das equações 3 e 4, a quantidade de soluto extraído (número de mols) após atingir o equilíbrio de partição poderá ser expressa através da Equação 5:

$$n_o^\infty = \frac{K_{hex} K_{hs} V_o C_o V_s}{K_{oh} K_{hs} V_o + K_{hs} V_h + V_s} \quad \textbf{Equação 5}$$

Em que K_{hs} é a constante de Henry para o soluto.

De acordo com a Equação 5, a quantidade de soluto sorvido na fase extratora está linearmente relacionada com a concentração inicial do soluto na amostra, permitindo assim, a análise quantitativa³⁻⁹.

Segundo Lord e Pawliszyn ¹, em muitos casos, a quantidade absoluta de soluto extraído é relativamente insignificante (<1%) quando comparada à quantidade inicial do mesmo na amostra. Assim sendo, a quantidade de soluto extraída não depende do volume da amostra, mas sim do equilíbrio de partição, o que permite ampliar o leque de aplicações da técnica, em determinações “on-line” ou *in situ*.

III.1.1.2 Aspectos Práticos

A **SPME** tem sido realizada pela exposição da fibra (fase extratora) diretamente na amostra, ou na fase gasosa (“headspace”) ^{2,3}, segundo o seguinte procedimento: com a fibra retraída no interior do amostrador SPME, o septo do frasco da amostra é perfurado pela agulha e a fibra exposta à amostra (modo direto ou “headspace”) (Figura III.3). Após atingir o equilíbrio de partição do soluto entre as fases (aquosa, polimérica e gasosa), a fibra é novamente retraída para o interior da agulha e esta é retirada do frasco. Esse procedimento permite também a coleta da amostra em locais distantes e transporte do dispositivo **SPME** para o laboratório.

Figura III.3. Procedimento SPME, (A) extração direta e (B) extração em fase gasosa (“headspace”).

Para análises por cromatografia gasosa a agulha do dispositivo **SPME** é inserida no injetor GC aquecido e a fibra é exposta no “liner” para rápida volatilização do soluto, ou seja, dessorção térmica (Figura III.4). Após o processo de dessorção, a fibra poderá ser utilizada em novas extrações, no entanto, é recomendável vedar a agulha com septo, para evitar contaminações da fibra.

Figura III.4. Dessorção térmica dos compostos extraídos por SPME para a análise por GC.

Para determinações de solutos pouco voláteis ou termicamente instáveis por LC, o processo de dessorção tem sido realizado em linha. O acoplamento com SPME/LC requer uma interface apropriada, em forma de um T (Figura III.5), 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 solutos poderá ser realizada no modo dinâmico, com a fase móvel, ou modo estático, para solutos fortemente sorvidos na fibra. Neste último modo, a fibra, anterior a eluição dos solutos 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 solutos ^{11, 12}.

Figura III.5. Interface SPME-LC ^{7, 8}.

O acoplamento SPME/LC apresenta algumas limitações, tais como: requer uma interface apropriada, dificuldades no acoplamento da interface SPME/LC e dessorção não eficiente dos solutos sorvidos pela fibra.

Queiroz e colaboradores ¹³ descreveram um simples sistema SPME/LC com dessorção “off line”, em frasco cônico com alguns μL de solvente orgânico (Figura III.6), o qual não requer a utilização de interface, para a determinação simultânea de lamotrigina, carbamazepina e 10, 11 epóxido carbamazepina em amostras de plasma.

Figura III.6. Dessorção "off-line" da técnica SPME.

A técnica SPME/CG, inicialmente empregada em análises de poluentes em amostras de água ^{4 - 9} tem sido aplicada com êxito na extração de fármacos voláteis e semivoláteis em análises de amostras biológicas ^{9, 10}, principalmente quando analisados no modo "headspace" ², pois 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 derivatização SPME/CG ou empregando o método SPME/LC (Tabela III.1).

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

Fármacos	Modo de extração e fibra	Sistema Analítico	LOD e/ou LOQ	Referência
Anticonvulsivantes tricíclicos	Direto CW/TPR 100 µm	LC - UV	LOQ = 0,05 a 1,0 µg mL ⁻¹	Queiroz <i>et al.</i> , 2002 ¹³
Ac. Micofenólico (Imunossupressor)	Direto CW/TPR 100 µm	LC - UV	LOD = 0,05 µg mL ⁻¹ ₁ LOQ = 0,12 µg mL ⁻¹ ₁	Zambonim <i>et al.</i> , 2004 ¹⁴
Benzodiazepínicos	Direto ADS	ADS - SPME LC - MS	LOD = 20 a 35 µg mL ⁻¹	Walles <i>et al.</i> , 2004 ¹¹
Naproxen (Anti-inflamatório)	Direto CW/TPR 100 µm	LC - UV	LOD = 0,03 µg mL ⁻¹ ₁ LOQ = 0,20 µg mL ⁻¹ ₁	Aresta <i>et al.</i> , 2005 ¹⁵
Anfetaminas	Direto PDMS – 7 e 100 µm PDMS/DVB 65 µm CW/TPR 50 µm CW/DVB 75 µm	LC - ESI - MS/MS	LOD = 0,03 a 0,4 µg L ⁻¹	Chou e Lee, 2005 ¹⁶
Fenotiazina (Anti-psicótico)	—	LC - ESI - MS/MS	—	Maurer, 2005 ¹⁷

Continua na página seguinte

Tabela III.1. Continuação da Tabela 1.

Fármacos	Modo de extração e fibra	Sistema Analítico	LOD e/ou LOQ	Referência
Ibuprofen (Anti-inflamatório)	Direto PDMS – 60 µm	LC - UV	LOQ = 0,25 µg mL ⁻¹	de Oliveira <i>et al.</i> , 2005 ¹⁸
Barbitúricos	Direto PDMS – 100 µm PA – 85 µm	LC – UV	—	Theodoridis <i>et al.</i> , 2006 ¹⁹
Novo fármaco	Direto PDMS-DVB	LC - MS	LOQ = 1 ng mL ⁻¹	Xie <i>et al.</i> , 2007 ²⁰
Fluoxetina e norfluoxetina	Direto PDMS-DVB 60µm	LC - UV	LOQ = 25 ng mL ⁻¹ LOD = 10 ng mL ⁻¹	Lanças <i>et al.</i> , 2007 ²¹
Ochratoxin A	Direto CW/TPR 50 µm PDMS/DVB 60µm	LC - FD	LOQ = 0,05 ng mL ⁻¹ LOD = 0,01 ng mL ⁻¹	Vatinno <i>et al.</i> , 2007 ²²
Antidepressivos Não tricíclicos	Direto PDMS/DVB 100µm	LC - UV	LOQ = 20 a 50 ng mL ⁻¹	Queiroz <i>et al.</i> , 2007 ²³
Antidepressivos Não tricíclicos	Direto PA 85µm PDMS/DVB 60µm CW/TPR 50µm	LC - DAD	LOD = 0,01 mg L ⁻¹	Unceta <i>et al.</i> , 2008 ²⁴

LD = limite de detecção, LOQ = limite de quantificação, PDMS = polidimetilsiloxano, PA = poliacrilato, DVB = divinilbenzeno, CW = carbowax, ADS = Alquil-diol sílica, ESI = ionização por eletro-spray, MS = espectrometro de massas, FD = detector de fluorescência, DAD = arranjo de diodo.

III.1.1.3 Otimização das variáveis SPME

Para a padronização dos métodos SPME/LC ou SPME/CG, com sensibilidade analítica adequada, a otimização das variáveis: fase extratora, temperatura e tempo de extração e dessorção, pH e força iônica da amostra, tempo e temperatura de dessorção, devem ser realizadas.

III.1.1.3a Temperatura de extração

A variação da temperatura de extração tem grande efeito sobre a microextração. Com o aumento da temperatura, o coeficiente de difusão do soluto aumenta, ou seja, a transferência de massas de soluto da amostra para a fase extratora 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 composto 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 processo¹.

III.1.1.3b Força iônica

A adição de sal (aumento da força iônica) poderá contribuir para o aumento das taxas de recuperação do processo SPME. O cloreto de sódio (NaCl) tem sido usado para esse fim. Geralmente, observa-se um aumento no rendimento das extrações, com o aumento da concentração de sal (efeito “salting out”), no entanto, após a saturação da amostra

poderá ocorrer sorção do sal junto à fase extratora e conseqüentemente diminuir a massa extraída.

O efeito “salting out” pode ser explicado por meio da formação da esfera de hidratação, em torno das moléculas iônicas do sal, reduzindo as moléculas de água disponíveis para solubilizar os solutos na amostra; desta forma, uma quantidade maior do soluto migra para a fase extratora. Por outro lado, os solutos polares podem participar de interações eletrostáticas com as moléculas de sal, reduzindo a difusão destes para a fase extratora ²⁵.

III.1.1.3c Tempo de extração

O tempo de extração é otimizado considerando se 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 composto 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 ¹.

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. Nesse caso, o controle das variáveis SPME deverá ser rigorosamente controlado, recomendando-se o uso do padrão interno, que dentre outras coisas, compensará possíveis erros decorrentes das variações no tempo de extração ^{26, 27}.

III.1.1.3d pH da matriz

O pH da amostra é importante para a extração de solutos que possuem grupos dissociáveis, dependentes do pH do meio. Somente as formas não-dissociadas dos solutos são extraídas pelos revestimentos SPME ¹. O pH da amostra tem sido controlado por uma solução tampão, onde a maioria dos solutos dissociados passará à forma não-dissociada, favorecendo o processo de extração ²⁵⁻²⁷. Em uma mistura tamponada, o processo SPME apresenta maior eficiência e linearidade quando comparado a uma mistura não tamponada, pois a razão entre as formas não-dissociadas e dissociadas permanece constante. Os solutos básicos, como os antidepressivos, têm sido analisados em pH básico e solutos ácidos, como os clorofenóis, têm sido extraídos em pH ácido ¹.

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 ²⁸.

III.1.1.3f Dessorção

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

III.1.1.3g Agitação

A cinética está relacionada ao processo de difusão dos solutos da matriz amostra à fase extratora. No modo direto, a fibra é inserida na matriz aquosa e a agitação da amostra, durante o processo **SPME**, é requerida para reduzir o “efeito da camada estática” ²⁵.

A amostra em contato com a fibra encontra-se estacionária e, à medida que a distância em relação à superfície da fibra torna-se maior, o movimento da amostra gradualmente aumenta, até igualar-se ao da maioria da amostra ¹⁻⁵. Essa região, ou camada estática, é denominada como camada limite de Prandtl, a qual tem sido determinada pelas condições de agitação e viscosidade da amostra, 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 partição ²⁵.

III.1.1.3h Fase extratora

A natureza química do soluto 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, na massa molar e na volatilidade do soluto ¹⁻⁵.

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 soluto com a fibra, maior será o coeficiente de partição, com isso maior a eficiência do processo **SPME** ²⁵.

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 se liquefazer em altas temperaturas. Tanto o PDMS quanto o PA extraem solutos baseados 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, nos quais a fase mais superficial é um sólido poroso. Nesses revestimentos predomina o processo de adsorção. A semelhança entre os processos de extração (adsorção e absorção) está no fato de que, em ambos, as moléculas do soluto migram para a fase extratora por meio do processo de difusão. Entretanto, no processo de absorção, os solutos atravessam a superfície do revestimento e difundem-se no mesmo durante a extração, enquanto que, na adsorção, os solutos permanecem na superfície do sólido ²⁶.

Em razão do número limitado de fases extratoras adequadas para análises de fármacos, principalmente básicos e polares, e baixa estabilidade dessas fibras em fase móvel ou solvente orgânico, o estudo e o desenvolvimento de novas fases extratoras com baixo custo e mais adequadas para análises de fármacos têm sido requeridos.

III.1.2 Poli(pirrol) como fase extratora para SPME

A baixa afinidade dos solutos junto às fibras extratoras **SPME** tem resultado em métodos cromatográficos com baixas taxas de recuperação (%), o que faz necessário o emprego de detectores de alta sensibilidade analítica ^{29 - 34}.

Novas fases extratoras **SPME** têm sido desenvolvidas, tais como: material de acesso restrito ³⁵, polímeros molecularmente impressos ^{36, 37} e polímeros condutores ³⁸. O emprego dessas novas fases tem resultado em métodos cromatográficos mais seletivos e de alta sensibilidade analítica para pequenas e grandes moléculas, mesmo em matrizes complexas.

Uma das alternativas promissoras para o desenvolvimento de novas fases extratoras, para a técnica **SPME**, tem sido os procedimentos eletroquímicos para a eletrodeposição de revestimento condutor ³⁹.

Os polímeros condutores são materiais versáteis; dentre eles, o poli(pirrol) (**PPY**) tem sido amplamente estudado devido às suas características físico-químicas favoráveis, como por exemplo, alta estabilidade no estado oxidado ³⁵.

O pirrol é um composto que apresenta uma estrutura heterocíclica insaturada de cinco membros, cujo heteroátomo é um nitrogênio e as insaturações estão situadas nos carbonos α e β , respectivamente.

A polimerização do pirrol poderá ser alcançada empregando o método químico oxidativo ou por meio da oxidação eletroquímica em meio aquoso ou orgânico, que ocorre com aplicação de potencial positivo a uma solução monomérica, contendo eletrólito suporte. O polímero formado eletroquimicamente apresenta-se em sua forma oxidada carga positiva, dessa forma, torna-se possível a incorporação de contra-ânions provenientes da solução eletrolítica em sua estrutura. A Figura III.7 ilustra o mecanismo de oxidação.

Figura III.7. Mecanismo de oxidação do pirrol.

Em razão dessas características, o poli(pirrol) tem sido empregado no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada e em processos de separação em técnicas analíticas.

Um modo relativamente simples de se estudar as variáveis eletroquímicas e controlar as características do polímero resultante tem sido por meio da voltametria cíclica (**CV**). Nessa técnica o potencial aplicado varia linearmente em função do tempo, e a corrente é medida em função do potencial aplicado.

Para a voltametria cíclica, tem sido utilizada uma célula eletroquímica constituída de três eletrodos imersos em solução, contendo o polímero e excesso de eletrólito não reativo, ou seja, eletrólito suporte. Um dos três eletrodos é o de trabalho; nesse eletrodo, o polímero será oxidado ou reduzido em sua superfície, com a varredura linear do potencial em função do tempo. A espessura do filme aumenta progressivamente com a repetição do procedimento de varredura do potencial (número de ciclos). O segundo eletrodo é o de referência, geralmente eletrodo de calomelano saturado ou de prata/cloreto de prata, cujo potencial permanece constante durante a eletrodeposição. O terceiro eletrodo é um contra-eletrodo, um fio enrolado de platina que é

utilizado para conduzir eletricidade da fonte através da solução para o eletrodo de trabalho.

Os polímeros com diferentes grupos funcionais podem ser facilmente formados na presença de diferentes eletrólitos suportes sob condições eletroquímicas controladas ⁴⁰⁻⁴³. A morfologia, a porosidade, as propriedades térmicas e mecânicas dos filmes de PPY também são influenciadas pelo tipo de contra-íon utilizado no procedimento eletroquímico ³⁵.

Os revestimentos PPY e poli-N-fenilpirrol (**PPPY**), preparados na superfície de barras metálicas (Pt, Au e aço inox) por meio da polimerização eletroquímica, quando comparados com as fibras **SPME** disponíveis no comércio, apresentaram melhor seletividade e sensibilidade para os solutos polares, aromáticos, básicos e aniônicos ³⁹. A seletividade do revestimento PPY pode ser modificada introduzindo um novo grupo funcional (fenil) ao polímero ⁴⁰.

Wu e colaboradores ⁴¹ por meio da eletrodeposição de PPY em eletrodos de platina, avaliaram a aplicabilidade desses eletrodos frente ao processo SPME e também a influência dos diferentes contra-íons utilizados no processo de eletrodeposição na seletividade do polímero resultante. Nesse trabalho, os autores observaram que os contra-íons volumosos, como o poliestirenosulfonato, exibiram maior eficiência de extração para solutos não polares em matrizes aquosas.

Outra vantagem de se utilizar polímeros condutores (PPY), como fase extratora, está relacionada com a capacidade de extração de espécies carregadas, sem a necessidade de uma etapa de derivatização ou complexação da amostra. Dessa forma, o PPY tem sido uma fase promissora para estudos miniaturizados de análises.

As fases extratoras de poli(pirrol) tem se mostrado uma boa alternativa para análises “in-tube” SPME/LC, um método de extração “on-line”, em que os solutos são extraídos e concentrados através da passagem da amostra pelo interior de um capilar de sílica fundida revestido internamente com a fase extratora. Esse capilar tem sido posicionado entre o amostrador e o compartimento de injeção do injetor automático.

Wu e Pawliszyn ^{42, 43} mostraram que capilares com revestimento de PPY exibem maior eficiência de extração para solutos polares e aromáticos, quando comparados às fases convencionais para “in-tube” SPME. O capilar com revestimento de PPY foi aplicado a análises de estimulantes em amostras de cabelo e urina ⁴², β -bloqueadores em amostras de urina e plasma ⁴³, em que os autores obtiveram melhor seletividade para a fase extratora de PPY quando comparado com os resultados obtidos com as fases extratoras comerciais.

Segundo os bons resultados dos trabalhos descritos, a seletividade e a eficiência do PPY deverão ser melhor investigadas como fase extratora para análises de fármacos em fluidos biológicos.

III. 2 OBJETIVOS

III.2.1 Desenvolvimento da fase extratora **SPME** de poli(pirrol) empregando a técnica de voltamentria cíclica.

III.2.1.2 Otimização das condições de eletrodeposição, de acordo com a seletividade dos filmes resultantes.

III.2.2 Padronização do método de microextração em fase sólida utilizando a fase extratora de polipirrol e cromatografia líquida de alta eficiência (**SPME-PPY/LC-UV**) para análise dos antidepressivos não tricíclicos: mirtazapina, citalopram, paroxetina, duloxetina, fluoxetina e sertralina, em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica.

III.2.2.1 Otimização das variáveis **SPME**.

III.2.3 Validação analítica do método **SPME-PPY/LC-UV** padronizado. Avaliação dos seguintes parâmetros de validação analítica: linearidade, precisão inter ensaios, recuperação, limite de quantificação e seletividade.

III.2.4 Avaliação da aplicabilidade do método **SPME-PPY/LC-UV** validado através das análises de amostras de plasma de pacientes idosos em terapia com antidepressivos.

III.3 MATERIAIS E MÉTODOS

III.3.1 Padrões analíticos e reagentes

Os padrões primários dos antidepressivos: fluoxetina, duloxetina foram gentilmente doados do laboratório, Lilly (São Paulo, Brasil) e a paroxetina doada por Libbs (São Paulo, Brasil). Citalopram, mirtazapina, sertralina, moclobemida foram doados pela Roche (São Paulo, Brasil), e clomipramina 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 1 mg mL⁻¹ em metanol. Essas soluções apresentaram estabilidade de 45 dias, quando permanecidas a -20°C.

O perclorato de lítio e perclorato de tetrabutilâmonio foram adquiridos da Sigma Aldrich (Steinheim, Germany).

O metanol e a acetonitrila, grau HPLC foram adquiridos do fornecedor J.T. Backer (Phillipsburg, USA). O ácido clorídrico, o borato de sódio, o ácido tricloro acético, o acetato de sódio foram adquiridos da Mallinckrodt Baker (México, México) e ácido acético da Merck e o gás argônio (99.999%) da Air Liquid. A água utilizada nos ensaios foi purificada pelo sistema Milli-Q, Millipore. A solução do monômero de pirrol utilizada foi adquirida da Aldrich Chemical Co (São Paulo, Brasil).

III.3.2 Amostras de plasma de referência

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

III.3.3 Amostras de plasmas de pacientes

As amostras de plasmas de pacientes em tratamento com antidepressivos foram gentilmente doadas pela Prof^a. Dr^a. Regina Helena Costa Queiroz do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP.

As amostras de plasma foram coletadas de pacientes idosos em terapia com antidepressivos, durante o período mínimo de duas semanas e após 12 horas da última administração do medicamento. Essas amostras foram coletadas segundo normas do Comitê de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP.

III.3.4 Eletrodeposição do filme de poli(pirrol) em eletrodo de aço inox

III.3.4.1 Sistema de purificação de nitrogênio

Para a purificação do N₂ utilizado nos ensaios de voltametria cíclica foi necessária a montagem de um sistema composto por três frascos lavadores.

Dois frascos foram preenchidos com uma amálgama de zinco e solução de metavanadato de amônio. O terceiro frasco com sílica gel. Esse sistema é ilustrado na Figura III.8.

Figura III.8. Sistema de purificação de N₂.

III.3.4.2 Desenvolvimento da fibra SPME com a fase extratora de poli(pirrol)

O potenciostato/galvanostato modelo PAR 273A, acoplado a um microcomputador 386, com o *software* M270, foi utilizado nos experimentos de voltametria cíclica.

Para os experimentos de voltametria cíclica, utilizou-se uma célula eletroquímica típica de três entradas ⁴⁴, como ilustra a Figura III.9. Os eletrodos empregados nos experimentos foram eletrodo de

calomelano saturado, como referência; platina, como contra-eletródo; eletródo de trabalho de aço inox 316 e 308 ($A = 0,98 \text{ cm}^2$). Os experimentos foram realizados em atmosfera inerte de nitrogênio, em solução eletrolítica (acetonitrila e contra-íon ou em ácido sulfúrico). Nesse trabalho, diferentes contra-íons foram avaliados na eletrodeposição do PPY, o perclorato de lítio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e o perclorato de tetrabutilamônio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Figura III.9. Representação esquemática da célula eletroquímica utilizada nesse trabalho.

Os eletrodos de aço inox foram polidos com esponja de aço, lavados com água destilada e acetona; e secos em estufa a 100°C por 24 horas.

Foram avaliadas como meio eletrolítico, uma solução de 1,0 mol L⁻¹ com os contra-íons em acetonitrila e também uma solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ em acetonitrila.

O pirrol foi previamente destilado, utilizando um destilador horizontal a vácuo. A eletrodeposição do pirrol foi realizada com potencial de varredura 1,2 V a 50 mV s⁻¹.

O número de ciclos empregado no processo de eletrodeposição foi também avaliado, para se estabelecer a relação entre o aumento na espessura do filme frente à seletividade da fase extratora resultante. Os voltamogramas foram realizados com 50, 100 e 200 ciclos nos diferentes meios eletrolíticos.

Os eletrodos resultantes da eletrodeposição foram empregados nas extrações dos seguintes fármacos: mirtazapina, citalopram, paroxetina, fluoxetina, duloxetina e sertralina, em amostras de plasma.

III.3.4.3 Microscopia eletrônica de varredura

As imagens de microscopia eletrônica foram realizadas empregando-se o microscópio eletrônico de varredura Zeiss EVO 50 com potencial de aceleração de 50 KV.

III.3.5 Otimização das variáveis SPME

As variáveis do processo **SPME** empregando-se a fibra de poli(pirrol), foram otimizadas para a obtenção de eficiente processo de

extração em menor tempo de análise. O primeiro passo foi avaliar a influência do pH. Foram avaliados quatro diferentes valores de pH da amostra: 3,8; 7,0; 9,0 e 10,0.

As variáveis tempo (30, 40, 50 e 60 minutos) e temperatura de extração (20, 40, 50 e 60°C) foram avaliadas simultaneamente.

Os volumes de amostra 1 mL, 500 μ L, 250 μ L, 100 μ L foram avaliados para se obter maior sensibilidade analítica, empregando-se o menor volume de amostra.

Os solventes, os volumes do solvente, a temperatura e o tempo de dessorção foram também otimizados, semelhantemente ao processo de extração.

Para otimização da SPME proposta, o seguinte procedimento foi realizado: a fibra de PPY foi inserida em um frasco de vidro cônico (5 mL) vedado com tampa rosca com septo de silicone, contendo o plasma enriquecido com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹ diluída em 4 mL da solução tampão. A extração foi realizada à temperatura e ao tempo pré-estabelecidos, com agitação magnética (1100 rpm).

A dessorção dos fármacos foi realizada em um frasco de vidro cônico de 500 μ L, em solvente selecionado (250 μ L) por tempo e temperatura estabelecidos. 50 μ L do extrato obtido foram injetados no sistema cromatográfico LC. Entre as extrações, as fibras foram submetidas à etapa de lavagem com solução de água e metanol (50:50, v/v).

III.3.6 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas no cromatógrafo líquido da Varian 230 ProStar (Varian, Califórnia, EUA), detector UV, $\lambda = 230$ nm. Os fármacos foram separados em coluna Lichrospher[®]60 RP-Select B (5 μ m, 250 x 4 mm), com pré-coluna RP-Select B, 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.

III.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

III.4.1 Eletropolimerização do filme de poli(pirrol) em eletrodo de aço inox

Os filmes de poli(pirrol) (PPY) podem ser preparados de duas maneiras: eletroquimicamente ou quimicamente, a partir da solução do seu monômero pirrol. Quando o polímero é formado eletroquimicamente, este apresenta carga positiva em sua forma oxidada, com isso, torna-se possível a incorporação contra-ânions provenientes da solução eletrolítica em sua estrutura.

Segundo Wu e Pawliszyn ⁴⁵, esses contra-íons não apresentam um papel importante na síntese do PPY, porém, permitem a manipulação da funcionalidade dos polímeros resultantes. Os polímeros têm sido eletrosintetizados em meio aquoso ou orgânico a baixo potencial anódico em ampla variedade de contra-íons.

Dessa forma, a seleção adequada do contra-íon influenciará na seletividade do polímero resultante. Nesse intuito, dois diferentes contra-íons, o perclorato de lítio e o perclorato de tetrabutylamônio, foram avaliados na eletrodeposição do PPY.

Os filmes de poli(pirrol) têm sido preparados eletroquimicamente com o uso de perclorato de lítio como eletrólito suporte ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e acetonitrila ^{42, 45}. Nessas condições o polímero resultante tem extraído espécies aniônicas de soluções aquosas, baseando-se na propriedade de troca de íons ⁴². Essa polimerização tem resultado em filmes com adequada porosidade, estabilidade térmica e mecânica. A substituição ou incorporação de outros contra-íons pode aprimorar essas propriedades e alterar a seletividade do filme conforme composto em estudo.

Antecedendo a polimerização do poli(pirrol), um voltamograma cíclico contendo somente a solução suporte foi realizado (Figura III.10). Dessa forma, certifica-se a ausência de possíveis interferentes presentes na solução.

Figura III.10. Voltamograma cíclico obtido em meio de acetonitrila e perclorato de lítio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando velocidade de varredura de 10 mV . Eletrodo de trabalho: aço inox 316, eletrodo de referência calomelano saturado, eletrodo auxiliar: fio de platina. Célula eletroquímica com capacidade máxima de 10 mL .

Posteriormente, utilizando o eletrodo de aço inox 316, o pirrol foi adicionado ao sistema que ficou sob agitação na presença de nitrogênio durante dez minutos. Após esse procedimento iniciou-se a eletrodeposição com velocidade varredura de 20 mV , em 50, 100 e 200 ciclos.

O voltamograma cíclico resultante da eletrodeposição em 200 ciclos é ilustrado na Figura III.11. Foi possível observar, em todos os números de ciclos avaliados, aumento nas correntes catódicas e anódicas, devido à polimerização do pirrol no eletrodo de trabalho. Um dos fatores atribuídos a esse tipo de comportamento é o fato de a superfície do eletrodo sofrer modificações conforme se aumenta a espessura do filme resultante.

O eletrodo de aço inox 308 foi também avaliado, porém, durante o processo de eletropolimerização observou-se constante sobrepotencial do sistema. A velocidade de varredura foi alterada, mas o sobrepotencial não foi contornado, dessa forma, esse eletrodo foi considerado inadequado para este sistema eletroquímico.

Os dois eletrodos de aço inox, empregados nessa pesquisa como eletrodos de trabalho, são classificados como austeníticos, sendo constituídos por ferro, níquel (7 a 20%) e cromo (17 a 25%), os quais possibilitam trabalhos empregando temperaturas elevadas (925°C) ou baixas (0°C).

Figura III.11. Voltamograma cíclico do pirrol $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em meio de acetonitrila e perclorato de lítio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura 10 mV em 200 ciclos. Eletrodo de trabalho: aço inox 316, eletrodo de referência, calomelano saturado, eletrodo auxiliar: fio de platina. Célula eletroquímica com capacidade máxima de 10 mL .

No decorrer da eletropolimerização do pirrol, observou-se que no contra eletrodo de platina também ocorreu a polimerização do pirrol. Esse fenômeno é decorrente da diminuta área do contra eletrodo (fio de 3 cm com 1 mm de diâmetro), quando comparada ao eletrodo de trabalho ($0,98 \text{ cm}^2$). Por essa razão, foram realizadas mudanças no sistema eletroquímico.

Para aumentar a área do contra-eletrodo, empregou-se um fio de platina (30 cm) na forma espiralada em uma célula eletroquímica com

capacidade máxima de 50 mL, porém, para uma célula nessas dimensões, o eletrodo padrão de hidrogênio foi utilizado como eletrodo de referência. Nos experimentos de voltametria cíclica empregando o eletrodo de hidrogênio utilizou-se como eletrólito suporte solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ em acetonitrila. O voltamograma cíclico obtido nessas condições pode ser observado na Figura III.12.

Figura III.12. Voltamograma cíclico em meio de acetonitrila e ácido sulfúrico 0,05 mol L⁻¹, utilizando velocidade de varredura de 10 mV. Eletrodo de trabalho: fio de aço inox 316, eletrodo de referência padrão de hidrogênio, eletrodo auxiliar: fio de platina espiralado. Célula eletroquímica com capacidade máxima de 50 mL.

O pirrol foi adicionado ao sistema e realizou-se a eletropolimerização em 200 ciclos, o voltamograma resultante pode ser observado na Figura III.13. As correntes catódicas e anódicas sofreram

diminuição na eletrodeposição do filme de pirrol. Na Figura III.13, foi observado o pico referente à oxidação do pirrol em 550 mV.

Figura III.13. Voltamograma Cíclico do pirrol $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em meio de acetonitrila e ácido sulfúrico $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando eletrodo de aço inox 316 com velocidade de varredura 10 mV em 200 ciclos. Eletrodo de trabalho: fio de aço inox 316, eletrodo de referência, padrão de hidrogênio, eletrodo auxiliar: fio de platina espiralado. Célula eletroquímica com capacidade máxima de 50 mL .

De acordo com Hermas e colaboradores ⁴⁶, os filmes de poli(pirrol) formados em meio ácido tem apresentado maior resistência à oxidação e à corrosão, assim como maior resistência mecânica, porém os filmes de PPY eletrodepositados em meio eletrolítico ácido, quando submetidos ao processo de extração **SPME**, mostraram se pouco estáveis e de baixa

seletividade para os antidepressivos (Figura III.14), sendo assim, novas modificações no sistema eletroquímico foram realizadas.

Figura III.14. Cromatograma referente à análise SPM-PPY/LC-UV utilizando eletrodo de aço 316 com filme de PPY eletrodepositado em meio eletrolítico de ácido sulfúrico. Condições de extração: amostra enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹, 4 mL de solução borato 0,05 mol L⁻¹ pH 9,0, agitação de 1100 rpm, por 45 minutos a 50°C. Dessorção em 3 mL de acetonitrila por 20 minutos a 50°C. 1 – moclobemida, 2 – fenacetina (padrão interno), 3 – paroxetina, 4 – mirtazapina, 5 – fluoxetina e 6 – clomipramina. Condições cromatográficas: fase móvel tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 3,8 e acetonitrila nas proporções (57: 43, v/v), coluna C18 Lichrospher RP-select B e detector UV-vis ($\lambda = 230$ nm).

Como as fases de PPY eletrodepositadas em meio eletrolítico contendo sais de perclorato apresentaram sensibilidade analítica satisfatória para análise dos antidepressivos, optou-se por realizar novamente a eletrodeposição nesses meios, tomando o cuidado de se utilizar um sistema eletroquímico mais adequado para esse procedimento. Novamente, empregando a célula eletroquímica com capacidade máxima de 10 mL composta com os eletrodos: referência (calomelano saturado), trabalho (fio de aço inox 316) e como contra eletrodo fio de platina espiralado (10 cm, próprio para esse sistema) e empregando perclorato de lítio e perclorato de tetrabutilamônio em acetonitrila, os filmes de PPY foram então eletropolimerizados. Os voltamogramas cíclicos, branco de referência e o obtido após eletropolimerização do PPY em meio eletrolítico de perclorato de lítio em 100 ciclos, encontram-se nas Figuras III.15 e III.16.

Figura III.15. Voltamograma cíclico da solução eletrolítica (acetonitrila e perclorato de lítio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), com velocidade de varredura de 10 mV . Condições eletroquímicas: eletrodo de trabalho, aço inox 316; contra-eletrodo, fio de platina espiralado; eletrodo de referência, calomelano saturado.

Figura III.16. Voltamograma Cíclico do pirrol $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em meio de acetonitrila e perclorato de lítio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando eletrodo de aço inox 316 com velocidade de varredura de 10 mV em 100 ciclos. Condições eletroquímicas: eletrodo de trabalho, aço inox 316; contra-eletrodo fio de platina espiralado; eletrodo de referência, calomelano saturado.

Além do tipo de contra-íon, o número de ciclos empregado no processo de eletrodeposição foi também avaliado, na tentativa de se verificar a influência do aumento na espessura do filme frente à eficiência no processo de extração. Os voltamogramas foram realizados com 50, 100 e 200 ciclos, em meio eletrolítico de perclorato de tetrabutylamônio e em meio de perclorato de lítio. Para revestimentos porosos, como o poli(pirrol), o aumento da espessura, não só aumenta o volume do revestimento total, mas também aumenta a área superficial total, o que pode resultar em extrações mais eficientes ⁴².

As fases extratoras de PPY, eletropolimerizadas em diferentes números de ciclos utilizando os dois contra-íons, foram submetidas ao processo SPME e análise LC-UV para os antidepressivos em análise simultânea. A eficiência da fase extratora de PPY eletrodepositada nos diferentes meios eletrolíticos em diferentes números de ciclos pode ser observada nas Figuras III.17 e III.18.

Figura III.17. Eficiência da fase extratora de PPY eletropolimerizada em meio de perclorato de lítio com diferentes números de ciclos, frente ao processo SPME. Condições de extração SPME: amostra de 1mL de plasma enriquecido com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹, 4 mL de solução borato 0,05 mol L⁻¹ pH 9,0, agitação de 1100 rpm, por 40 minutos a 50°C. Dessorção em 3 mL de acetonitrila a 50°C por 20 minutos.

Figura III.18. Eficiência da fibra de PPY eletropolimerizada em meio de perclorato de tetrabutilamônio com diferentes números de ciclos, frente ao processo SPME. Condições de extração SPME: amostra de 1mL de água enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹, 4 mL de solução borato 0,05 mol L⁻¹ pH 9,0, agitação de 1100 rpm, por 40 minutos a 50°C. Dessorção em 3 mL de acetonitrila a 50°C por 20 minutos.

Segundo Zhou e colaboradores ⁴⁷, altos potenciais (V) empregados nos processos de eletrodeposição resultam em cátions radicais oligoméricos com um alto nível de cargas e estrutura polimérica de cadeias longas. Pequenas mudanças em uma única variável podem

influenciar nas propriedades do polímero resultante. Quando a eletrodeposição é realizada com o monômero em concentrações em níveis de traço ($1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), a onda redox formada, conforme o filme vai crescendo, é deslocada para valores positivos de corrente ⁴⁸. Conforme resultado obtido na Figura III.16.

Os polímeros incorporados com ânions pequenos, como o perclorato de lítio, apresentam propriedades trocadoras de ânions ⁴⁹. Em contrapartida, os filmes incorporados com ânions grandes, como poliestirenosulfonato, apresentam propriedades trocadoras catiônicas, devido à diminuição da mobilidade do contra-ânion com o aumento do seu tamanho. Quando moléculas de tamanho intermediário são empregadas, os polímeros apresentam propriedades trocadoras de cátions e ânions ⁴⁵.

As características estruturais dos filmes de PPY com diferentes contra-íons foram investigadas por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (**MEV**). Conforme ilustrado nas Figuras III.19 e III.20, as superfícies das fases extratoras possuem diferentes estruturas porosas. Essas estruturas porosas podem aumentar significativamente a área efetiva do filme e conseqüentemente aumentar a eficiência de extração. Esse fato vem corroborar com os resultados obtidos com as fibras desenvolvidas para processo **SPME**.

A fase extratora de PPY, eletropolimerizada em meio de perclorato de lítio em acetonitrila durante 100 ciclos (Figura III.19), apresentou morfologia mais porosa, quando comparada à fibra eletropolimerizada em meio de perclorato de tetrabutilamônio em acetonitrila com o mesmo número de ciclos (Figura III.20).

Figura III.19. Microscopia eletrônica de varredura da fibra de PPY eletropolimerizada em meio eletrolítico de perclorato de lítio em acetonitrila. Condições de eletrodeposição: eletrodo de trabalho, fio de aço inox 316; contra-eletrodo, fio de platina espiralado; eletrodo de referência, calomelano saturado; velocidade de varredura 10 mV s^{-1} em 100 ciclos.

Figura III.20. Microscopia eletrônica de varredura da fibra de PPY eletropolimerizada em meio eletrolítico de perclorato de tetrabutylamônio em acetonitrila. Condições de eletrodeposição: eletrodo de trabalho, fio de aço inox 316; contra-eletrodo, fio de platina espiralado; eletrodo de referência, calomelano saturado; velocidade de varredura 10 mV s⁻¹ em 100 ciclos.

Por meio da análise dos voltamogramas cíclicos obtidos da eletrodeposição em perclorato de lítio e em perclorato de tetrabutylamônio pode-se observar a maior carga resultante do processo de eletrodeposição do PPY em perclorato de lítio quando comparada ao perclorato de tetrabutylamônio (Figura III.21), o que pode também ter

contribuído para a maior porosidade desse filme, conforme observado nas imagens de MEV (Figura III.19) observado nesse trabalho.

Figura III.21. Voltamogramas cíclico obtidos para a eletrodeposição do PPY em meio eletrolítico de perclorato de lítio (LiClO_4) ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e em meio de perclorato de tetrabutilamônio (PTBA) ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Condições eletrodeposição: eletrodo de trabalho, fio de aço inox 316; contra-eletrodo, fio de platina espiralado; eletrodo de referência, calomelano saturado; velocidade de varredura 10 mV s^{-1} em 1 ciclo; potencial de varredura de 0 a 1,2 V.

A robustez da fase extratora de PPY foi também avaliada por meio das imagens de MEV. As fibras após serem submetidas à cerca de 30 extrações exibiram significativa perda na eficiência de extração. As imagens de MEV dessas fibras mostraram uma ligeira compactação do filme (Figura III.22), o que justifica o decréscimo da eficiência SPME. Além disso, as imagens da MEV revelaram que as fases extratoras de

PPY são biocompatíveis, pois não se observa a presença dos compostos endógenos do plasma na fase extratora, mesmo após 30 extrações.

Figura III.22. Microscopia eletrônica de varredura da fibra de PPY, eletrodepositada em perclorato de lítio em acetonitrila, após 30 extrações. Condições de eletrodeposição: eletrodo de trabalho, fio de aço inox 316; contra-eletrodo, fio de platina espiralado; eletrodo de referência, calomelano saturado; velocidade de varredura 10 mV s^{-1} em 100 ciclos.

Dentre as condições de eletrodeposição avaliadas, os melhores resultados foram obtidos nas seguintes condições: fio de aço inox 316 como eletrodo de trabalho, fio de platina espiralado (10 cm) como contra-eletrodo, eletrodo de calomelano saturado como eletrodo de referência e solução eletrolítica de perclorato de lítio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila.

As fases de PPY desenvolvidas foram empregadas nas análises SPME/LC dos seguintes fármacos: fenacetina (padrão interno),

moclobemida, mirtazapina, citalopram, paroxetina, fluoxetina, duloxetine, sertralina e clomipramina. A eficiência das fases PPY desenvolvidas frente ao processo de extração dos antidepressivos pode ser observada na Figura III.23.

Com base no cromatograma apresentado na Figura III.23 fica evidente a superior seletividade da fase extratora de PPY eletrodepositada em meio eletrolítico de perclorato de lítio em acetonitrila (100 ciclos), quando comparada à fase de PPY eletrodepositado em meio ácido (Figura III.14), embora este último filme tenha sido depositado em maior número de ciclos (200 ciclos).

Embora nas Figuras III.16 e III.17, a fluoxetina e a duloxetine tenham apresentado maior eficiência SPME com a fase de PPY eletropolimerizada em perclorato de tetrabutilamônio, em 100 e 200 ciclos respectivamente, optou-se pela condição mais favorável para a maioria dos fármacos, fibra de PPY eletropolimerizada em meio de perclorato de lítio, após 100 ciclos.

A espessura do recobrimento foi estimada em aproximadamente 20 µm, com base na lei de Faraday (Equação 6):

$$d = \frac{Q \cdot M}{2 \cdot F \cdot \rho} \quad \text{Equação 6}$$

Em que ρ é a densidade do poli(pirrol), M a massa molar, Q a somatória das cargas totais para a eletropolimerização do PPY e F a constante de Faraday ⁴⁷. O valor de Q foi obtido com a integração da área do voltamograma obtido. De acordo com a geometria do fio de aço inox utilizado nesse trabalho, o filme formado apresenta o volume total de fase de aproximadamente 19,6 µL.

Figura III.23. Cromatograma obtido após análise SPME-PPY/LC-UV empregando a fase extratora de PPY eletrodepositado em meio eletrolítico de perclorato de lítio e acetonitrila. FEN- fenacetina, MOC- moclobemida; MIR- mirtazapina; CIT- citalopram; PAR- paroxetina; DUL- duloxetina; FLU-fluoxetina; SER- sertralina e CLO-clomipramina. Amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹ e diluída em 4,0 mL de solução borato, pH 9,00, 0,05 mol L⁻¹. Condições cromatográficas: fase móvel empregada: tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 3,8 e acetonitrila nas proporções (57: 43, v/v), coluna C18 Lichrospher RP-select B e detector UV-vis ($\lambda = 230$ nm).

Definidos os números de ciclos e o contra-íon empregado no processo de eletrodeposição, foi possível iniciar a otimização das variáveis intrínsecas a técnica SPME com a fibra de PPY.

III.4.2 Padronização do método SPME-PPY/LC-UV para análise simultânea de antidepressivos em amostras de plasma

As principais variáveis SPME: pH, força iônica, tempo e temperatura de extração e de dessorção, foram otimizadas para obtenção de eficiente processo de extração em menor tempo de análise. A otimização das variáveis SPME foram realizadas, considerando-se o equilíbrio de adsorção dos fármacos entre as fases polimérica (PPY) e matriz biológica.

III.4.2.1 Influência do pH da matriz

A primeira variável avaliada na padronização do método **SPME-PPY/LC-UV** foi o pH da solução utilizada na diluição da amostra. Para este propósito quatro diferentes soluções em diferentes valores de pH (4,0, 7,0, 9,0 e 10,0) foram avaliados. A Figura III.24 ilustra os resultados obtidos para os antidepressivos extraídos em soluções com diferentes valores de pH.

De acordo com os resultados na Figura III.24, a sensibilidade do método **SPME-PPY/LC-UV** foi aumentada com a diluição da amostra com solução tampão fosfato pH 7,0, nesse valor de pH os antidepressivos encontram-se totalmente ou parcialmente na forma não-iônica (pKa entre 8,7 a 10,2) ³³. Segundo Wu e colaboradores ⁵¹, a seletividade da fase extratora de PPY diminui consideravelmente com o decréscimo do pH da solução devido à repulsão eletrostática entre solutos básicos e o filme de PPY, pois em baixos valores de pH ambos encontram-se positivamente carregados.

Figura III.24. Influência do pH da matriz no processo SPME-PPY. Condições de extração: agitação (1100 rpm), temperatura 50°C, por 45 minutos. Amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹ e diluída em 4,0 mL de solução tampão em diferentes valores de pH (borato 0,05 mol L⁻¹, pH 9,00 e pH 11, fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 4,0 e pH 7,0), durante 45 minutos, à temperatura 50°C, sob agitação (1100 rpm). O processo de dessorção foi realizado sob agitação em 3 mL de acetonitrila por 15 minutos a 50°C.

III.4.2.2 Otimização do tempo e temperatura de extração

De acordo com a fase extratora presente na fibra **SPME**, dois processos de extração podem ocorrer, a absorção ou a adsorção ³¹. Quando a fibra empregada extrai os solutos tipicamente via absorção, a extração ocorre com o equilíbrio de partição do composto entre as fases aquosa (amostra) e estacionária (fase extratora).

As fases extratoras adsorventes extraem os solutos por interações físicas, a qual ocorre por retenção dos solutos na superfície da fase extratora ⁵⁰. Nessas fases, como há um número limitado de sítios de

adsorção, ocorre competição entre os solutos pelos sítios ativos da superfície, fato não observado em fases extratoras absorventes.

Quando vários fármacos estão presentes em uma amostra, os solutos com baixa afinidade pela fase extratora adsorvem rapidamente e são substituídos ou deslocados por solutos com altos coeficientes de afinidade pela fase extratora, os quais requerem maior tempo de extração para atingirem o equilíbrio. Portanto, é de extrema necessidade otimizar as variáveis, tempo e temperatura de extração, tentando encontrar a condição na qual a eficiência de extração seja máxima para a maioria dos solutos em estudo.

A eficiência do processo SPME foi avaliada em diferentes tempos (30, 40, 50 e 60 minutos) e temperaturas (25, 40, 50 e 60°C) de extração para cada soluto, Figuras III.25 a III.28.

Figura III.25. Otimização dos tempos de extração a 20°C para os fármacos: fenacetina (FEN), moclobemida (MOC), mirtazapina (MIR), citalopram (CIT), paroxetina (PAR), duloxetina (DUL), fluoxetina (FLU) e sertralina (SER). Amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹ e diluída em 4,0 mL de solução tampão fosfato, pH 7,00, 0,05 mol L⁻¹, sob agitação (1100 rpm).

Figura III.26. Otimização dos tempos de extração a 40°C para os fármacos: fenacetina (FEN), moclobemida (MOC), mirtazapina (MIR), citalopram (CIT), paroxetina (PAR), duloxetina (DUL), fluoxetina (FLU) e sertralina (SER). Amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹ e diluída em 4,0 mL de solução tampão fosfato, pH 7,00, 0,05 mol L⁻¹, sob agitação (1100 rpm). O processo de dessorção foi realizado sob agitação em 3 mL de acetonitrila por 15 minutos a 50°C.

Figura III.27. Otimização dos tempos de extração a 50°C para os fármacos: fenacetina (FEN), moclobemida (MOC), mirtazapina (MIR), citalopram (CIT), paroxetina (PAR), duloxetina (DUL), fluoxetina (FLU) e sertralina (SER). Amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹ e diluída em 4,0 mL de solução tampão fosfato, pH 7,00, 0,05 mol L⁻¹, sob agitação (1100 rpm). O processo de dessorção foi realizado sob agitação em 3 mL de acetonitrila por 15 minutos a 50°C.

Figura III.28. Otimização dos tempos de extração a 60°C para os fármacos: fenacetina (FEN), moclobemida (MOC), mirtazapina (MIR), citalopram (CIT), paroxetina (PAR), duloxetina (DUL), fluoxetina (FLU) e sertralina (SER). Amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹ e diluída em 4,0 mL de solução tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 7,00, sob agitação (1100 rpm). O processo de dessorção foi realizado sob agitação em 3 mL de acetonitrila por 15 minutos a 50°C.

Durante o processo de otimização das variáveis **SPME**, a temperatura de 50°C apresentou os melhores resultados para a maioria dos solutos, porém as fibras apresentaram-se pouco estáveis nessa temperatura. As fibras, quando submetidas a essa temperatura, apresentaram a formação de grandes rachaduras no filme decorrentes da expansão do aço inox e subsequente retorno ao volume inicial à temperatura ambiente. Dessa forma, os demais experimentos foram realizados a temperatura de 25°C, tanto para a extração quanto para dessorção dos fármacos, para aumentar a robustez das fibras de poli(pirrol) eletrodepositadas. O tempo ótimo de extração na temperatura de 25 °C foi avaliado, e os resultados estão apresentados na Figura III.29.

Com o objetivo de diminuir a competição entre os fármacos (Figuras III.24 a III.27) pelos sítios ativos da fase extratora, o padrão interno e a moclobemida, amitriptilina e imipramina não foram adicionados nas análises seguintes. O uso de padrão interno para análises quantitativas em fluidos biológicos tem sido recomendado. No entanto, o método **SPME-PPY/LC-UV** desenvolvido apresentou precisão inter ensaio com adequados valores de coeficiente de variação, conforme será visto na descrição dos parâmetros de validação analítica.

Embora em 40 minutos, o equilíbrio de sorção não tenha sido alcançado para a maioria dos antidepressivos (Figura III.29), este foi selecionado para as extrações seguintes, pois as **SPME** realizadas durante 40 minutos a 25°C apresentaram sensibilidade analítica adequada para análise dos antidepressivos no intervalo terapêutico.

Figura III.29. Otimização dos tempos de extração a 25°C para os antidepressivos. Amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹ e diluída em 4,0 mL de solução tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0. O processo de dessorção foi realizado sob agitação em 3 mL de acetonitrila por 15 minutos à 25°C.

III.4.2.3 Mecanismo de extração

Como a fase extratora poli(pirrol) apresenta mecanismo de extração via processo de adsorção ⁵², é possível que ocorra competição entre os antidepressivos de maior afinidade pelos sítios ativos presentes na superfície da fase extratora.

Segundo a Figura III.29 observou-se que com o aumento do tempo de extração, alguns fármacos foram deslocados ou substituídos por outros de maior afinidade pela fase extratora de PPY. A fluoxetina e a duloxetina decrescem com o aumento da eficiência de extração para a mirtazapina, a paroxetina e o citalopram. Esse efeito é menos pronunciado até o tempo de extração de 40 minutos.

O processo de competição entre os fármacos e a superfície de PPY pode ser ilustrado pela comparação das análises **SPME** de duloxetina em amostra de plasma enriquecidas somente com duloxetina e amostra de plasma enriquecida com todos os antidepressivos (Figura III.30). Segundo os resultados da Figura III.30 observou-se que as taxas de recuperação de duloxetina na análise simultânea foram maiores quando comparados às taxas na extração individual.

Na análise simultânea em razão da competição dos fármacos na superfície de PPY, a eficiência **SPME** diminui com o aumento do tempo de extração, já na análise individual o equilíbrio de sorção não foi atingido no período de tempo de extração de 30 a 60 minutos, ou seja, observou-se o aumento linear da quantidade extraída com o aumento do tempo de extração.

Cho e colaboradores ⁵⁰, empregando uma fibra **SPME** com recobrimento misto (carboxen e polidimetilsiloxano) para análise de hidrocarbonetos aromáticos, observaram que em processos adsorptivos, as moléculas de maior afinidade pela fase extratora podem substituir

moléculas de menor afinidade. Esse fato foi observado para o benzeno e o tolueno, os quais apresentaram menores taxas de recuperação na análise simultânea, quando comparadas às taxas obtidas nas análises individuais.

Figura III.30. Processo SPME-PPY/LC-UV para a duloxetina (300 ng mL^{-1}) em análise simultânea e individual a 25°C . Amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL^{-1} (simultânea) e amostra de plasma enriquecida com a duloxetina na concentração de 500 ng mL^{-1} , ambas diluídas em $4,0 \text{ mL}$ de solução tampão fosfato, $\text{pH } 7,00$, $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, à temperatura de 25°C em diferentes tempos de extração sob agitação (1100 rpm). O processo de dessorção foi realizado sob agitação em $250 \text{ }\mu\text{L}$ de fase móvel por 15 minutos a 25°C . $50 \text{ }\mu\text{L}$ do extrato foi injetado no sistema cromatográfico. Condições cromatográficas: fase móvel empregada foi tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH } 3,8$ e acetonitrila nas proporções ($57: 43, \text{ v/v}$), coluna C18 Lichrospher RP-select B e detector UV-vis ($\lambda = 230 \text{ nm}$).

III.4.2.4 Influência da força iônica

Devido ao mecanismo de adsorção na superfície do PPY, optou-se por não avaliar a influência da força iônica no processo de extração da adição de NaCl, pois poderia ocorrer a adsorção desses íons junto a fase extratora de PPY, diminuindo os sítios ativos disponíveis.

III.4.2.5 Dessorção “off-line”

Dentre os solventes avaliados para dessorção (acetonitrila, metanol e fase móvel), a fase móvel (tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 3,8 e acetonitrila 57:43, v/v) apresentou os melhores resultados para todos os antidepressivos, sendo então, selecionada para os ensaios seguintes.

O tempo de dessorção foi também avaliado, para a obtenção da maior sensibilidade analítica no processo SPME-PPY/LC-UV para as fibras de PPY. Os resultados obtidos são ilustrados na Figura III.31. Ressaltando que a temperatura empregada tanto para extração quanto para dessorção foi de 25°C, devido à baixa resistência térmica dos polímeros resultantes à temperaturas superiores.

Figura III.31. Avaliação do tempo de dessorção para os antidepressivos. Condições de extração: 1,0 mL de amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹ e diluída em 4,0 mL de solução tampão fosfato, pH 7,00, 0,05 mol L⁻¹, a temperatura 25°C, durante 40 minutos sob agitação (1100 rpm). O processo de dessorção foi realizado em 250 µL de fase móvel, a 25°C em diferentes tempos. 50 µL do extrato foram injetados no sistema cromatográfico. Condições cromatográficas: fase móvel empregada tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 3,8 e acetonitrila nas proporções (57: 43, v/v), coluna C18 Lichrospher RP-select B e detector UV-vis ($\lambda = 230$ nm).

III.4.2.6 Otimização do volume de amostra

Como o processo **SPME** baseado no equilíbrio de sorção não é exaustivo, ou seja, o aumento do volume não aumenta a quantidade de soluto extraído ^{1-3, 52}; o volume da amostra de plasma foi também otimizado. Diferentes volumes de amostra foram submetidos ao processo **SPME-PPY/LC-UV**, empregando a fase extratora (19,6 µL)

para se obter maior sensibilidade analítica do método proposto. A Figura III.32 ilustra os resultados obtidos com os diferentes volumes avaliados. Os melhores resultados foram obtidos com o volume de 250 μL de amostra. Além do ajuste da razão entre o volume da fase e o volume da amostra de plasma, a diminuição da concentração dos compostos endógenos do plasma também pode ter contribuído para o aumento da eficiência do processo **SPME**, com o volume de 250 μL de amostra de plasma.

Figura III.32. Influência do volume de amostra de plasma no processo SPME-PPY/LC-UV. Amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹ e diluída em 4,0 mL de solução tampão fosfato, pH 7,00, 0,05 mol L⁻¹, à temperatura de 25°C, durante 40 minutos sob agitação (1100 rpm). O processo de dessorção foi realizado em 250 μL de fase móvel, a 25°C durante 15 minutos. 50 μL do extrato foram injetados no sistema cromatográfico.

III.4.2.7 Condições SPME otimizadas

Segundo a otimização das variáveis SPME, os melhores resultados foram obtidos nas condições descritas no Quadro 1.

Quadro I.1.

Condições SPME-PPY selecionadas:

- ✓ pH da amostra = 7,0;
- ✓ diluição da amostra = solução tampão
fostato 0,05 mol L⁻¹;
- ✓ modo de extração = direta;
- ✓ temperatura de extração = 25°C;
- ✓ tempo de extração = 40 minutos;
- ✓ volume de amostra = 250 µL;
- ✓ força iônica = sem adição de sal;
- ✓ solvente de dessorção = fase móvel;
- ✓ temperatura de desorção = 25°C;
- ✓ tempo de dessorção = 15 minutos.

II.4.3 Validação analítica do método SPME-PPY/LC-UV

O método SPME-PPY/LC-UV proposto foi validado segundo normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Conforme já mencionado no Capítulo II.

III.4.3.1 Seletividade do Método SPME-PPY/LC-UV

A seletividade do método **SPME-PPY/LC-UV** é demonstrada por meio dos cromatogramas do plasma branco de referência e do plasma branco de referência enriquecido com antidepressivos na concentração de 300 ng mL⁻¹, apresentados nas Figuras III.33 e III.34, respectivamente. Algumas amostras de plasma adicionais (branco de referência) foram também avaliadas. Nessas amostras, a resposta de picos interferentes no tempo de retenção dos antidepressivos foi inferior a 20% do sinal cromatográfico desses fármacos, em concentrações correspondentes ao limite de quantificação.

O método **SPME-PPY/LC-UV** apresentou especificidade, pois segundo as Figuras III.33 e III.34 não foram observados picos interferentes no mesmo tempo de retenção dos antidepressivos.

A seletividade do processo SPME é influenciada por fatores como: massa molar, tamanho, ponto de ebulição e pressão de vapor do composto, além da polaridade e presença de grupos funcionais na fase extratora e no soluto ⁵⁰.

A eficiência das extrações com a fase PPY pode ser explicada em razão das propriedades multifuncionais do polímero que podem resultar em interações hidrofóbicas, ácido-base e $\pi - \pi$ ^{40, 41, 45, 50}. Uma vez que o

poli(pirrol) é ligeiramente ácido e os antidepressivos bases fracas segundo seus valores de pK_a ³³.

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 solutos, injetadas individualmente nas mesmas condições cromatográficas. Os espectros (absorbância *versus* comprimento de onda) na região do ultravioleta (UV) também foram considerados (Anexo 3).

Figura III.33. Cromatograma obtido após extração SPME – PPY/LC-UV do plasma branco de referência. Condições cromatográficas: fase móvel empregada, tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 3,8 e acetonitrila nas proporções (57: 43, v/v), coluna C18 Lichrospher RP-select B e detector UV-vis ($\lambda = 230$ nm).

Figura III.34. Cromatograma obtido após extração SPME-PPY/LC-UV dos antidepressivos: mirtazapina, citalopram, paroxetina, duloxetine, fluoxetine e sertralina na concentração de 300 ng mL^{-1} . Condições cromatográficas: fase móvel empregada: tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3,8 e acetonitrila nas proporções (57: 43, v/v), coluna C18 Lichrospher RP-select B e detector UV-vis ($\lambda = 230 \text{ nm}$).

Os antidepressivos podem ser prescritos em combinação com diferentes agentes psicotrópicos e/ou outros fármacos, portanto, é importante avaliar a co-eluição destes com os fármacos analisados (Tabela III.2).

Tabela III.2. Tempo de retenção dos fármacos estudados como possíveis interferentes.

Fármacos	Tempo de retenção (min)
Cafeína	2,42
PEMA	2,54
Primidona	2,55
Moclobemida	2,62
Diclofenaco	2,68
Diazepam	2,72
Flurazepam	3,42
Propanolol	3,69
Fenobarbital	3,80
Mirtazapina	4,15
Clonazepam	4,36
Carbamazepina	4,30
Fenitoína	4,60
Desipramina	5,08
Citalopram	5,26
Amitriptilina	6,05
Paroxetina	6,16
Duloxetina	7,13
Fluoxetina	8,23
Sertralina	9,41
Lidocaína	10,33
Clomipramina	11,05

Segundo a Tabela III.2, os agentes psicotrópicos e outros fármacos não co-eluíram com os antidepressivos em estudo.

III.4.3.2 Linearidade do Método SPME -PPY/LC - UV

A linearidade do método padronizado foi determinada utilizando amostras de plasma (branco de referência) enriquecidas com os fármacos nas concentrações do limite de quantificação, 80, 100, 300, 500 e 1200 ng mL⁻¹. Os intervalos avaliados apresentaram-se lineares com coeficientes de correlação maiores que 0,998 e os coeficientes de variação dos pontos da curva de calibração foram menores que 15% conforme Tabela III.3. As curvas obtidas podem ser observadas no Anexo 4.

Tabela III.3. Linearidade, limite de quantificação (LOQ) e coeficiente de variação (C.V.) do método SPME-PPY/LC -UV para análise simultânea.

Fármaco	Regressão linear (LOQ – 1200 ng mL ⁻¹)	r ²	LOQ (ng mL ⁻¹)	C. V. (%)
Mirtazapina	y = 7384,05 + 61,76 x	0,998	16,0	11,82
Citalopram	y = 2702,01 + 7,55 x	0,999	20,0	13,45
Paroxetina	y = 1719,29 + 10,09 x	0,999	20,0	13,72
Duloxetina	y = 8914,69 + 58,67	0,998	16,0	14,24
Fluoxetina	y = 2069,17 + 10,77 x	0,998	25,0	13,78
Sertralina	y = 2454,18 + 8,94 x	0,998	25,0	13,85

III.4.3.3 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LOQ) foi determinado como a menor concentração da curva analítica, na qual o coeficiente de variação (C.V.) foi menor que 15% (Tabela III.3). O LOQ foi também determinado pelo sinal cromatográfico dez vezes superior a qualquer interferência da amostra branco, no tempo de retenção dos antidepressivos. Coeficientes de variação inferiores a 15% demonstram adequada precisão do método.

O cromatograma obtido da análise simultânea dos antidepressivos em amostras de plasma na concentração referente ao limite de quantificação pode ser observado na Figura III.35.

Figura III.35. Cromatograma obtido após análise SPME-PPY/LC-UV dos antidepressivos: mirtazapina, citalopram, paroxetina, duloxetine, fluoxetine e sertralina na concentração referente ao limite de quantificação dos antidepressivos. Condições cromatográficas: fase móvel empregada, tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 3,8 e acetonitrila nas proporções (57: 43, v/v), coluna C18 Lichrospher RP-select B e detector UV-vis ($\lambda = 230$ nm).

III.4.3.4 Recuperação, Precisão Inter Ensaio e Exatidão

A recuperação foi calculada pela comparação direta das razões das áreas obtidas após determinações SPME-PPY/LC-UV.

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

Em SPME, o volume da fase extratora é consideravelmente reduzido, o volume máximo comercialmente encontrado é 0,5 µL (filmes com espessura de 100 µm) ¹. Conseqüentemente, a técnica SPME tem baixa sensibilidade analítica e baixas taxas de recuperação principalmente para análise de solutos polares com fibras comerciais ^{41,45}.

Recentemente, Queiroz e colaboradores ²³ determinaram os mesmos antidepressivos em estudos nesse trabalho, empregando a fibra SPME com revestimento de polidimetilsiloxano – divinilbenzeno, utilizando o método SPME/LC. Nesse trabalho os autores obtiveram taxas de recuperação entre 8,08 a 17,10% empregando condições ótimas de extração. No entanto, o método SPME/LC padronizado apresentou sensibilidade analítica adequada para análise dos antidepressivos para fins de monitorização terapêutica.

Na Tabela III.4 encontram-se ilustrados os valores de recuperação absoluta, precisão inter ensaio e exatidão dos antidepressivos para as análises **SPME-PPY/LC-UV** em amostras de plasma enriquecido em dois níveis de concentração, baixo e alto; para cada concentração os testes foram realizados em replicada.

O volume de fase extratora de PPY desenvolvida próximo a 20 μL e a alta área superficial da fibra de PPY (0,98 cm^2) favoreceram altas taxas de recuperação. No entanto, vale ressaltar que a diminuição nas taxas de recuperação com o aumento na concentração da amostra pode ser atribuída às características adsorptivas da fase extratora de PPY. As baixas concentrações diminuem a competição pelos sítios ativos da superfície, aumentando, portanto, a capacidade extratora da fase. Além disso, com a otimização do volume de amostra utilizado, os limites quantificação variaram de 20 a 50 ng mL^{-1} para 16 a 25 ng mL^{-1} e as taxas de recuperação de 15% para 91,4%, considerando a maior taxa obtida.

Tabela III.4. Recuperação, exatidão e precisão inter-ensaio nas concentrações de LQ e 200 ng mL^{-1} .

Fármaco	Concentração adicionada (ng mL^{-1})	Concentração obtida $\pm \sigma$	Recuperação absoluta (%)	C. V. (%)
Mirtazapina	16,0	15,6 $\pm$ 0,8	88,80	11,82
	200,0	198,0 $\pm$ 0,6	68,20	10,00
Citalopram	20,0	20,3 $\pm$ 0,7	88,90	13,45
	200,0	202,0 $\pm$ 0,7	70,13	11,20
Paroxetina	20,0	19,2 $\pm$ 0,9	30,80	13,72
	200,0	199,0 $\pm$ 0,9	26,86	11,85
Duloxetina	16,0	15,3 $\pm$ 0,9	82,19	14,24
	200,0	197,0 $\pm$ 1,1	66,25	12,58
Fluoxetina	25,0	23,5 $\pm$ 0,5	91,38	13,78
	200,0	197,5 $\pm$ 0,6	78,82	12,01
Sertralina	25,0	24,3 $\pm$ 0,4	72,25	13,85
	200,0	198,7 $\pm$ 0,4	70,10	10,58

III.4.4 Aplicabilidade do método SPME-PPY/LC

Segundo os parâmetros de validação analítica, o método **SPME-PPY/LC-UV** é adequado para análise de antidepressivos em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica, apresentando repetitividade, precisão inter ensaio, limite de quantificação, linearidade e seletividade de acordo com os valores preconizados pela ANVISA.

Para avaliar a aplicabilidade do método padronizado, uso clínico, amostras de plasma de pacientes em terapia com os antidepressivos foram analisadas, Figuras III.36 A, III.36 B e III.36 C.

As concentrações dos fármacos determinadas nas amostras de plasma foram as seguintes: 28,79 ng mL⁻¹ de mirtazapina (Figura III.36 A), 89,5 ng mL⁻¹ de duloxetina (Figura 36 III.B) e 61,25 ng mL⁻¹ de citalopram (Figura III.36 C). As amostras de plasmas foram coletadas de pacientes em terapia com: Remeron® (45 mg/dia), Cymbalta® (60 mg/dia) e Celexa® (40 mg/dia), respectivamente. Segundo a literatura, as concentrações determinadas encontram-se dentro do intervalo terapêutico.

Figura III.36 A. Análise SPME-PPY/LC-UV de amostra de plasma de paciente em terapia com antidepressivo mirtazapina, concentração plasmática determinada: 28,79 ng mL⁻¹. Condições cromatográficas: fase móvel empregada, tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 3,8 e acetonitrila nas proporções (57: 43, v/v), coluna C18 Lichrospher RP-select B e detector UV-vis ($\lambda = 230$ nm).

Figura III.35 B. Análise SPME-PPY/LC-UV de amostras de plasmas de pacientes em terapia com antidepressivo duloxetina, concentração plasmática determinada: $89,50 \text{ ng mL}^{-1}$. Condições cromatográficas: fase móvel empregada, tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3,8 e acetonitrila nas proporções (57: 43, v/v), coluna C18 Lichrospher RP-select B e detector UV-vis ($\lambda = 230 \text{ nm}$).

Figura III.36 C. Análise SPME-PPY/LC-UV de amostras de plasmas de pacientes em terapia com antidepressivo citalopram, concentração plasmática determinada: $61,25 \text{ ng mL}^{-1}$. Condições cromatográficas: fase móvel empregada, tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3,8 e acetonitrila nas proporções (57: 43, v/v), coluna C18 Lichrospher RP-select B e detector UV-vis ($\lambda = 230 \text{ nm}$).

III.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de novas fases extratoras **SPME** tem sido extremamente importante, pois no mercado, encontramos um número limitado de fibras adequadas à análise de fármacos, principalmente os básicos e polares. As fibras comerciais têm apresentado baixa estabilidade na presença de solventes orgânicos, na fase móvel e em matrizes biológicas. As fibras de poli(pirrol), desenvolvidas neste projeto, mostraram-se estáveis na fase móvel utilizada nas análises LC e em soluções de diferentes valores de pH, permitindo a utilização de solução tampão em pH adequado, segundo o equilíbrio ácido-base dos solutos em solução.

As principais variáveis do processo de eletrodeposição dos filmes de PPY foram avaliadas, sendo que os melhores resultados foram obtidos com o filme polimerizado em meio de perclorato de lítio 0,1 mol L⁻¹ em acetonitrila, após 100 ciclos. Segundo os estudos de microscopia eletrônica de varredura, esses filmes apresentaram estrutura mais porosa e área efetiva superior ao filme desenvolvido em meio de perclorato de tetrabutylamônio.

Segundo os parâmetros de validação analítica avaliados, o método **SPME-PPY/LC-UV** padronizado apresentou repetitividade, exatidão, linearidade e seletividade adequados à análise dos antidepressivos: mirtazapina, citalopram, paroxetina, duloxetine, fluoxetine e sertralina em amostras de plasma; apresentando robustez em até 30 extrações.

Os fármacos apresentaram limites de quantificação dentro do intervalo terapêutico. Dessa forma, o método padronizado pode ser empregado em análises para fins de monitorização terapêutica.

III.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. *Journal of Chromatography A*, v. 902, p. 17-63, 2000.
2. PAWLISZYN, J. *Applications of solid phase microextraction*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999.
3. PAWLISZYN, J. Theory of Solid-Phase Microextraction. *Journal of Chromatography Science*, v. 38, p. 270-278, 2000.
4. ARTHUR, C.L., KILLAM, L.M., BUCHHOLZ, D., PAWLISZYN, J. Automation and optimization of solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*, v. 64, n.17, p. 1960 - 1966, 1992.
5. PROSEN, H., ZUPANCIC-KRALJ, L. Solid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 18, n. 4, p. 272 - 282, 1999.
6. VALENTE, A. L. P., AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. *Química Nova*, v. 24, n° 4, 2000.
7. 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). *Journal of Environmental Science Health*, v. 38, n. 4, p. 417-428, 2003.
8. 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. *Journal of Chromatography Science*, v. 40, n. 9, p. 489 – 494, 2002.

9. 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. *Journal of Environmental Science Health*, v. 36, n. 5, p. 517 - 527, 2001.
10. 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. *Journal of Chromatography B*, v. 794, n. 2, p. 337 - 342, 2003.
11. WALLIS, M., MULLETT, W. M., PAWLISZYN, J. Monitoring of drugs and metabolites in whole blood by restricted-access solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1025, n. 1, p. 85-92, 2004.
12. 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. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analyses*, v. 17, p. 1081-1087, 1998.
13. 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. *Journal of Separation Science*, vol.25, n. 1-2, p. 91- 95, 2002.
14. ZAMBONIN, C. G., ARESTA, A., PALMISANO, F. Determination of the immunosuppressant mycophenolic acid in human serum by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 806, n. 2, p. 89-93, 2004.

15. ARESTA, A., PALMISANO, F., ZAMBONIN, C. G. Determination of naproxen in human urine by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 39, n. 3-4, p. 643 – 647, 2005.
16. 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*, v. 538, n. 1-2, p. 49-56, 2005.
17. 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*, v. 38, n. 4, p. 310-318, 2005.
18. OLIVEIRA, A. R. M., CESARINO, E. J., BONATO, P. S. Solid-phase microextraction and chiral HPLC analysis of ibuprofen in urine. *Journal of Chromatography B*, v. 818, n. 2, p. 285-291, 2005.
19. THEODORIDIS G. Application of solid-phase microextraction in the investigation of protein binding of pharmaceuticals. *Journal of Chromatography B*, v. 830, n. 2 , p. 238-244, 2006.
20. XIE, W; PAWLISZYN, J.; MULLET, W. M.; MATUSZEWSKI, B. K. Comparasion of solid-phase microextraction and liquid-liquid extraction in 96-well format for the determination of a drug compound in human plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analyses*, v. 45, p. 599-608, 2007.
21. FERNANDES, C.; NETO, A. J. S.; RODRIGUES, J. C.; ALVES, C.; LANÇAS, F. M. Solid-phase microextraction - liquid chromatography

(SPME/LC) determination of fluoxetine and norfluoxetine in plasma using a heated liquid flow through interface. *Journal of Chromatography B*, v. 847, p. 217-223, 2007.

22. VATINNO, R.; ARESTA, A.; ZAMBONIM, C. G.; PALMISANO, F. Determination of ochratoxin A in human urine by solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography – fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analyses*, v. 44, p. 1014- 1018, 2007.

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

24. UNCETA, N.; CABALLERO, A. G.; SANCHEZ, A.; MILLAN, S.; SAMPEDRO, M. C.; GOICOLEA, M. A.; SALLES, J.; BARRIO, R. J. Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine and their main metabolites in human urine samples by solid – phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analyses*, v. 46, p. 763-770, 2008.

25. PAWLISZYN, J. *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. Wiley-VCH United States of America 1° ed., p. 49-58, 1997.

26. YUAN, H. *Bio-applications of Solid Phase Microextraction*. 2000. 201f. Tese (Doutorado em Filosofia da Química) – University of Waterloo – Ontário, Canadá, 2000.

27. ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 902, n.1, p.167-194, 2000.

28. KUMAZAWA, T., LEE, X. P., SATO, K., SUZUKI, O. Solid-phase microextraction and Liquid Chromatography / Mass Spectrometry in drug analysis. *Analytical Chimica Acta*, v. 492, p. 49 – 67, 2003.
29. HAWTHORNE, S. B.; MILLER, D. J.; ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solventless determination of caffeine in beverages using solid-phase microextraction with fused – silica fibers. *Journal of Chromatography*, v. 603, p. 185-191, 1992.
30. MUSTEATA, F. M.; PAWLISZYN, J.; QIAN, M. G.; JING-TAO, W.; MIWA, G.T. Determination of drug binding by solid phase microextraction. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 95, n. 8, p. 1712 – 1722, 2006.
31. PARREIRA, F. V.; CARDEAL, Z. L. Amostragem de solutos orgânicos voláteis no ar utilizando a técnica de microextração em fase sólida. *Química Nova*, v. 28, n. 4, p. 646 – 654, 2005.
32. 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 eight new antidepressants and five of their active metabolites in plasma after overdose. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 25, n. 5, p. 581 – 587, 2003.
33. TOURNEL, G.; HOUDRET, N.; DEVEAUX, M.; GOSSET, D.; LHERMITTE, M. High - performance liquid chromatographic method to screen and quantitative seven selective serotonin reuptake inhibitors in human serum. *Journal of Chromatography B*, v. 761, p. 147- 158, 2001.
34. WILLE, S. M. R.; MAUDENS, K. E.; VAN PETEGHEN, C. H.; LAMBERT, W. E. E. Development of a solid phase extraction for 13 'new' generation antidepressants and their active metabolites for gas

chromatography – mass spectrometric analyses. *Journal of Chromatography A*, v. 1098, p. 19-29, 2005.

35. 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. *Journal of Chromatography A*, v. 1025, p. 85 -92, 2004.

36. MULLETT, W. M.; MARTIN, P.; PAWLISZYN, J. In-tube molecularly imprinted polymer solid-phase microextraction for the selective determination of propranolol. *Analytical Chemistry*, v. 73, p. 2383 - 2389, 2001.

37. BASHEER, C.; JEGARDESAN, S.; VALIYAVEETIL, H.; LEE, K. H. Sol-gel-coated oligomers as novel stationary phases for solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, v. 1087, p. 252 - 258, 2005.

38. WU, J.; PAWLISZYN, J. Electrochemically controlled solid-phase microextraction based on conductive polypyrrole films. *Analytical Chemistry*, v. 73, p.4855 - 4859, 2001.

39. WU, J.; LORD, H.; PAWLISZYN, J.; KATAOKA, H. Polypyrrole-coated capillary solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the determination of β -blockers in urine and serum samples *Journal of Microcolumn Separations*, v.12, p. 255 - 266, 2000.

40. WU, J.; PAWLISZYN, J. Preparation and application of polypyrrole films in solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, v. 909, p. 37-52, 2001.

41. WU, J.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction based on polypyrrole films with different counter ions. *Analytica Chimica Acta*, v. 520, p. 257-264, 2004.
42. 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*, v. 54, p. 655- 672, 2001.
43. WU, J.; LORD, H.; PAWLISZYN, J.; KATAOKA, H. Polypyrrole-coated capillary solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the determination of β -blockers in urine and serum samples. *Journal of Microcolumn Separations*, v.12, p. 255 - 266, 2000.
44. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; CARACELLI, I. *Princípios de análise instrumental*. Bookman, 5ed., p. 579, São Paulo, SP, 1999.
45. WU, J.; PAWLISZYN, J. Solid-phase extraction based on polypyrrole films with different counter ions. *Analytica Chimica Acta*, v. 520, p. 257 -264, 2004.
46. HERMAS, A. A.; NAKAYAMA, M.; OGURA, K. Formation of stable passive film on stainless steel by electrochemical deposition of polypyrrole. *Eletrochimica Acta*, v. 50, p. 3640 – 3647, 2005.
47. ZHOU, M.; HEINZE, J. Electropolymerization of pyrrole and electrochemical study: 1 Evidence of structural diversity of polypyrrole. *Eletrochimica Acta*, v. 44, p. 1733 – 1748, 1999.
48. TÜKEN, TUNÇ Polypyrrole films on stainless steel *Surface & Coating Technology*, v. 200, p. 4713 – 4719, 2006.

49. WU, J.; PAWLISZYN, J. Polypyrrole-coated capillary coupled to HPLC for in-tube soli-phase microextraction and analysis of aromatic compounds in aqueous samples. *Analytical Chemistry*, v. 73, p. 55 – 63, 2001.
50. CHO, H-J.; BAEK, K.; LEE, H-H.; LEE, S-H.; YANG, J-W. Competitive extraction of multi-component contaminants in water by carboxen-polydimethylsiloxane fiber during solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, v. 988, p. 177 – 184, 2003.
51. WU, J.; MULLET, W. M.; PAWLISZYN, J. Eletrochemically controlled solid-phase microextraction based on conductive polypyrrole films. *Analytical Chemistry*, v. 74, p. 4855 – 4859, 2002.
52. THEODORIDIS, G.; KOSTER, E. H. M.; JONG, G.J. Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. *Journal of Chromatography B*, v. 745, p. 49- 82, 2000.

Anexo 1

ESPECTRO UV-VIS DOS ANTIDEPRESSIVOS (SBSE/LC-UV)

ANEXO 2

CURVAS ANALÍTICA (SBSE/LC-UV)

ANEXO 3**ESPECTROS UV-VIS DOS ANTIDEPRESSIVOS (SPME-PPY/LC-UV)**

ANEXO 4**CURVAS ANALÍTICAS (SPME-PPY/LC-UV)**

ANEXO 5

Currículo Resumido

Auxílio à pesquisa

DESENVOLVIMENTO DA FASE EXTRATORA SPME DE POLI(PIRROL) E AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS SPME/LC E SBSE/LC PARA ANÁLISES DE ANTIDEPRESSIVOS EM AMOSTRAS DE PLASMA Coordenador: Maria Eugênia Costa Queiroz, CNPq, Doutorado, Institucional, 03/2004 a 04/2008.

Artigo publicado:

-**CHAVES, A. R.**, MACIEL, S. S., QUEIROZ, R. H. C., LANCAS, F. M., QUEIROZ, M. E. C. Stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with UV detection for determination of antidepressants in plasma samples. *Journal of Chromatography. B*, v.850, p.295 - 302, 2007.

Artigos aceitos para publicação:

-**CHAVES, A. R.**, QUEIROZ, M. E. C. Extração sortiva em barra de agitação para análise de fármacos em fluidos biológicos. *Química Nova* (Online), 2008.

-QUEIROZ, R. H. C., BERTUCCI, C., MALFARÁ, W. R., DREOSI, S. A. C., **CHAVES, A. R.**, VALÉRIO, D. A. R., QUEIROZ, M. E. C. Quantification of carbamazepine, carbamazepine 10, 11 epoxide, phenytoin and phenobarbital in plasma samples by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008.

Artigo submetido à publicação:

-**CHAVES, A. R.**, CHIERICATO, G. J., QUEIROZ, M. E. C. Development of poly(pyrrole) coating for solid-phase microextraction and liquid chromatography with UV detection of antidepressants in plasma samples, *Analytical Clinica Acta*, submetido a publicação.

Outras Informações biográficas:

- Revisor do Journal of Chromatography B, de Junho a Novembro de 2006.

Atividades extra curriculares:

- Proferiu a palestra, intitulada “ Cromatografia: contribuições na prevenção e no tratamento de doenças” durante a II Olimpíada Regional de Química, em 2004 e realizada pelo Centro de Ensino Integrado em Química, pertencente ao Departamento de Química da FFCLRP-USP.

- Estagiária do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino, no Departamento de Química da FFCLRP. Disciplina: Química Analítica Quantitativa, 2º semestre de 2005 sob a orientação do Prof. José Fernando de Andrade e Profª. Maria Eugênia Q. Nassur

- Estagiária do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino, no Departamento de Química da FFCLRP. Disciplina: Análise Instrumental, 2º semestre de 2007 sob a orientação da Profª. Drª. Maria Eugênia Q. Nassur

Participação e apresentação de trabalhos em eventos científicos:

- **CHAVES, A. R.;** CHIERICATO, G. J.; QUEIROZ, M. E. C. Development of polypyrrole coating for solid-phase microextraction and liquid chromatography of antidepressants in plasma samples. *32nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*, 10 a 16 de maio de 2008, Baltimore, MD, EUA.

- ALMEIDA, G. F., **CHAVES, A. R.**, GONCALVES, L. S., QUEIROZ, M. E. C. Determination and quantification of mandibular gland pheromones in Africanized bees for studies of behaviour using liquid chromatography, APIMONDIA, Melbourne, Australia.

- **CHAVES, A. R.**, BANIN, T. M., SILVA, B. R., CHIERICATO JUNIOR, G., QUEIROZ, M. E. C. Influência do método de polimerização do poli(pirrol) na seletividade das fibras SPME para análises de antidepressivos. *14° Encontro Nacional de Química Analítica*, outubro de 2007, João Pessoa, Pb, Brasil.

- **CHAVES, A. R.**, CHIERICATO JUNIOR, G., QUEIROZ, M. E. C. Development of polypyrrole coating on a stainless-steel wire and its application to the determination of antidepressants in plasma samples using solid-phase microextraction. *II SIMCRO*, outubro de 2006, São Pedro, SP, Brasil.

- L. P. MELO, A. M. NOGUEIRA, **CHAVES, A. R.**, LANCAS, F. M., QUEIROZ, M. E. C. Desenvolvimento da barra extratora PDMS/PPY e otimização das variáveis SBSE/LC para a análise de antidepressivos em amostras de plasma. *II SIMCRO*, outubro de 2006, São Pedro, SP, Brasil.

- **CHAVES, A. R.**, MACIEL, S. S., QUEIROZ, R. H. C., LANCAS, F. M., QUEIROZ, M. E. C. Simultaneous determination of antidepressants in plasma samples by stir bar sportive extraction and liquid chromatography. *XI COLACRO*, junho de 2006, Mérida, México.

- **CHAVES, A. R.**, CHIERICATO JUNIOR, G., LANCAS, F. M., QUEIROZ, M. E. C. Eletrodeposição de filmes de poli(pirrol) e sua aplicação como fase extratora nas análises SPME/LC de antidepressivos em amostras de plasma. *13° ENQA*, setembro de 2005, Niterói, RJ, Brasil.

- **CHAVES, A. R.**, MACIEL, S. S., QUEIROZ, R. H. C., LANCAS, F. M., QUEIROZ, M. E. C. Otimização das variáveis do processo “stir bar sorptive extraction” (SBSE) na análise SBSE/LC de antidepressivos em amostras de plasma. 7° *EXTECH*, novembro de 2005, Campinas, SP, Brasil.

- **CHAVES, A. R.**, QUEIROZ, M. E. C., LANCAS, F. M., QUEIROZ, R. H. C. Avaliação das técnicas LLE/LC e SPME/LC na análise de fluoxetina em amostras de plasma de pacientes. *X COLACRO*, outubro de 2004, Campos de Jordão, SP, Brasil.