

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Padronização e validação do método extração sortiva em
barra de agitação e cromatografia líquida de alta eficiência
(SBSE/HPLC) para a determinação de antidepressivos em
amostras de plasma**

Silvana Maciel Silva

Ribeirão Preto
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Padronização e validação do método extração sortiva em
barra de agitação e cromatografia líquida de alta
eficiência (SBSE/HPLC) para a determinação de
antidepressivos em amostras de plasma**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título
de Mestre em Toxicologia

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado(a): Silvana Maciel Silva

Orientador(a): Profa Dra Maria
Eugênia Queiroz Nassur

Ribeirão Preto

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Silva, Silvana Maciel

Padronização e validação do método extração sortiva em barra de agitação e cromatografia líquida de alta eficiência (SBSE/HPLC) para a determinação de antidepressivos em amostras de plasma, 2007

103 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Nassur, Maria Eugênia Queiroz.

1.Extração sortiva em barra de agitação. 2.Cromatografia líquida de alta eficiência.3.Antidepressivos

Silvana Maciel Silva

Padronização e validação do método extração sortiva em barra de agitação e cromatografia líquida de alta eficiência (SBSE/HPLC) para a determinação de antidepressivos em amostras de plasma

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Toxicologia

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador(a): Profa Dra Maria Eugênia Queiroz Nassur

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Ao meu marido, Marcelo, pela sua presença, a sua
companhia constante, o seu sorriso carinhoso e suas
palavras de incentivo nos momentos mais difíceis...*

*As minhas amadas meninas, Laís e Fernanda, que
souberam entender os momentos de ausência e que hoje
compartilham minha conquista.*

*Aos meus pais, meu preito de agradecimento por suas
expressões de amor e por terem me proporcionado o início da
realização de um sonho.*

*A Deus pela minha existência e por ter me concedido a
graça da vitória.*

À Profa Dra Maria Eugênia Queiroz Nassur, por me conceder a oportunidade realizar esse trabalho, por me transmitir tantos ensinamentos... pelo incentivo e orientação.

Ao Prof. Dr. Dermeval de Carvalho pela confiança depositada em mim, e por ter me incentivado a ingressar na pós-graduação

À Profa Dra Katyana França Bonini Camilo por ter disponibilizado o Laboratório de Biofarmacotoxicologia da Universidade de Ribeirão Preto para realização das análises.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Saraiva Miranda, meu sincero muito obrigado por toda sua amizade, ensinamentos, e compreensão nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Leonardo Regis Pereira pela amizade, sugestões e colaboração.

À Profa Dra Regina Helena Queiroz pelas sugestões e colaboração, minha gratidão.

A todos os amigos do Curso de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Ribeirão Preto, em especial ao Robison e à Edna pelo apoio, companheirismo e pelo convívio agradável em todo esse tempo.

Ao Bruno e à Andréa, do Laboratório de Química Analítica da FFCLRP, pela imensa colaboração e pela amizade.

Enfim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

*“De tudo, ficaram três coisas:
a certeza de que estamos sempre começando...
a certeza de que precisamos continuar...
a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...
Portanto, devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro.”*

(Fernando Pessoa)

RESUMO

SILVA, S. M. **Padronização e validação do método extração sortiva em barra de agitação e cromatografia líquida de alta eficiência (SBSE/HPLC^a) para a determinação de antidepressivos em amostras de plasma.** 2007. 103 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

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 (ISRSs): citalopram 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 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, partição) do analito. Neste trabalho, as técnicas SBSE e cromatografia líquida de alta eficiência foram avaliadas para a análise simultânea dos 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 ANVISA, em diferentes concentrações plasmáticas, as quais contemplam o intervalo terapêutico. O método SBSE/HPLC padronizado apresentou linearidade na faixa de concentração plasmática de 20 a 1000 ng mL⁻¹, precisão interensaio com coeficientes de variação menor que 14% e recuperação relativa de 83 a 110%. Segundo a validação analítica, a metodologia SBSE/HPLC apresentou linearidade, alta sensibilidade, seletividade e precisão analítica adequadas para a análise dos antidepressivos: imipramina, amitriptilina, nortriptilina, desipramina, citalopram e sertralina, em amostra de plasma, para fins de monitorização terapêutica.

Palavras-chave: Extração sortiva em barra de agitação. Cromatografia líquida de alta eficiência. Antidepressivos tricíclicos. Inibidores seletivos da recaptação de serotonina. Plasma.

SUMMARY

SILVA, S. M. Development and validation of the stir bar sorptive extraction and high performance liquid chromatography (**SBSE/HPLC**) method for antidepressant determination in plasma samples. 2007. 103 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Therapeutic drug monitoring allows individualization of drug dosage assuring its clinical efficacy and at the same time minimizing adverse effects of the drugs prescribed in clinics. The antidepressants have been monitored since they present a very well established therapeutic interval. In this sense, most of the patients whose plasmatic concentrations are ranged at that interval present psychiatric disorders under control and drug adverse effects at bearable levels. Despite tricyclic antidepressants (TCAs) such as imipramine, amitriptyline, nortriptyline and desipramine are highly efficient and widely used, they also present undesirable adverse effects. The antidepressants: citalopram and sertraline, which are selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), present clinical efficacy comparable to the classic TCAs, but with no adverse effects associated to the last ones. Liquid-liquid extraction (LLE) and solid phase extraction (SPE) have been usually employed in biological sample pre-treatment for chromatographic analysis. A new technique named sorptive stir bar extraction (SBSE) for sample pre-concentration of organic compounds from biological samples was recently proposed. This technique is based on static extraction through the polymer polydimethylsiloxane (PDMS), in which analyte sorption occurs. In this work, SBSE and HPLC techniques have been evaluated for antidepressants simultaneous analysis in plasma samples for therapeutic drug monitoring. The chromatographic conditions of analysis, as well as SBSE parameters (time, temperature, ionic strength, matrix pH, desorption time) have been optimized in order to obtain best analytical sensitivity. Analytical validation was carried out according to the norms established by ANVISA, in different plasmatic concentrations, which represent the therapeutic interval. The SBSE/HPLC method developed showed linearity in a concentration plasmatic ranging from 20 to 1000 ng mL⁻¹, inter assay precision with coefficient of the variation lower than 14%, and relative recovery from 83 a 110%. Based on analytical validation, the SBSE/HPLC methodology showed good linearity, high sensitivity, selectivity and suitable repeatability to the analyzed antidepressants: imipramine, amitriptyline, nortriptyline, desipramine, citalopram and sertraline in plasma samples for therapeutic drug monitoring.

Key-words: Stir bar sorptive extraction, high performance liquid chromatography, tricyclic antidepressants, selective serotonin reuptake inhibitors. Plasma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estruturas química dos antidepressivos tricíclicos (ADTs).....	06
Figura 2 -	Ilustração do mecanismo de ação dos ADTs. Inibição da recaptção neural de serotonina (5-HT) e noradrenalina (NA), promovendo um aumento os neurotransmissores na fenda sináptica.....	06
Figura 3 -	Estruturas química dos antidepressivos ISRSs.....	13
Figura 4 -	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.....	18
Figura 5 -	Dispositivo da fibra de SPME: (A) Posição da fibra retraída na agulha (tubo de diâmetro externo 0,56 mm), (B) Posição com a fibra exposta.....	19
Figura 6 -	(a) Processo de extração SPME, (b) Processo de dessorção térmica SPME-GC, (c): Processo de dessorção SPME-HPLC.....	22
Figura 7 -	Barras magnéticas SBSE revestidas com PDMS, procedentes da Gerstel.....	25
Figura 8 -	Recuperação de solutos em função do coeficiente de partição octanol-água ($K_{o/w}$) para as técnicas, SPME (10 mL amostra, fibra PDMS, 100 μ m de espessura) e SBSE (10 mL amostra, camada de PDMS 10 mm x 0,5 mm).....	27
Figura 9 -	Processo SBSE.....	28
Figura 10 -	Dessorção Térmica SBSE-GC.....	30
Figura 11 -	Dessorção SBSE-LC "off-line".....	31
Figura 12 -	SBSE no <i>headspace</i>	31
Figura 13 -	Esquema dos componentes de um sistema de HPLC....	38

Figura 14 -	Cromatograma referente à análise da solução padrão dos antidepressivos (500 ng mL ⁻¹).....	59
Figura 15 -	Eficiência do processo SBSE em diferentes temperaturas e tempos de extração, para as análises de citalopram.....	62
Figura 16 -	Eficiência do processo SBSE em diferentes temperaturas e tempos de extração, para as análises de desipramina.....	62
Figura 17 -	Eficiência do processo SBSE em diferentes temperaturas e tempos de extração, para as análises de nortriptilina.....	63
Figura 18 -	Eficiência do processo SBSE em diferentes temperaturas e tempos de extração, para as análises de imipramina.....	63
Figura 19 -	Eficiência do processo SBSE em diferentes temperaturas e tempos de extração, para as análises de amitriptilina.....	64
Figura 20 -	Eficiência do processo SBSE em diferentes temperaturas e tempos de extração, para as análises de sertralina.....	64
Figura 21 -	Eficiência do processo SBSE em diferentes temperaturas e tempos de extração, para as análises de clomipramina.....	65
Figura 22 -	Efeito da força iônica na eficiência da SBSE.....	66
Figura 23 -	Efeito da variação do pH da matriz no processo SBSE..	68
Figura 24 -	Comparação da eficiência do processo SBSE segundo os modos de extração: 1-agitação com aquecimento e 2- ultra-som.....	69
Figura 25 -	Perfil da quantidade extraída de cada antidepressivo em função do tempo de dessorção.....	70
Figura 26 -	Curva de calibração obtida para Citalopram.....	74
Figura 27 -	Curva de calibração obtida para Desipramina.....	75

Figura 28 -	Curva de calibração obtida para Nortriptilina.....	75
Figura 29 -	Curva de calibração obtida para a. Imipramina.....	76
Figura 30 -	Curva de calibração obtida para Amitriptilina.....	76
Figura 31 -	Curva de calibração obtida para Sertralina.....	77
Figura 32 -	Cromatograma SBSE/HPLC obtido de plasma branco de referência.....	82
Figura 33 -	Cromatograma SBSE/HPLC referente à amostra de plasma de referência enriquecida com antidepressivos (500 ng mL ⁻¹).....	83
Figura 34 -	Cromatograma referente à análise de amostras de plasma de pacientes em terapia com antidepressivos..	86
Figura 35 -	Cromatograma referente à análise de amostras de plasma de pacientes em terapia com antidepressivos..	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Efeito dos antidepressivos no bloqueio dos receptores.	07
Tabela 2 -	Efeitos adversos relacionados ao bloqueio de receptores.....	07
Tabela 3 -	Intervalo de concentração plasmática dos ADTs propostos como terapêuticos para o controle da depressão.....	09
Tabela 4 -	Antidepressivos tricíclicos: nome comercial e posologia.....	10
Tabela 5 -	Antidepressivos ISRSs: nome comercial e posologia....	13
Tabela 6 -	Métodos convencionais de preparo de amostras biológicas para análise cromatográfica de antidepressivos.....	16
Tabela 7 -	Aplicações da técnica SBSE nas áreas ambiental e alimentícia.....	33
Tabela 8 -	Aplicações da técnica SBSE para análises de fluidos biológicos.....	35
Tabela 9 -	Condições cromatográficas empregadas na análise dos antidepressivos em amostras de plasma.....	50
Tabela 10 -	Ordem de eluição dos antidepressivos e seus respectivos tempos de retenção.....	58
Tabela 11 -	Pka dos antidepressivos analisados.....	67
Tabela 12 -	Parâmetros de linearidade obtidos na validação do método SBSE/HPLC.....	73
Tabela 13 -	Recuperação relativa dos antidepressivos em três níveis de concentração.....	78
Tabela 14 -	Precisão interensaios do método SBSE/HPLC em três níveis de concentração.....	79
Tabela 15 -	Precisão interensaios realizada com amostras de plasma enriquecidas com os antidepressivos na concentração de 20 ng mL ⁻¹	81

Tabela 16 - Concentração plasmática determinada para amostras de plasma de pacientes em terapia com antidepressivos.....	85
--	----

LISTA DE SIGLAS

ISRS	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina
ADTs	Antidepressivos Tricíclicos
IMAs	Inibidores da Monoaminoxidase
NA	Noradrenalina
5-HT	Serotonina
DA	Dopamina
TDM	Monitorização terapêutica de fármacos
LLE	Extração líquido-líquido
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Micro extração em fase sólida
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
PDMS	Polidimetilsiloxano
SBSE	Extração sortiva em barra de agitação
TD	Dessorção térmica
GC	Cromatografia gasosa
PCBs	Bifenilas policloradas
PAHs	Hidrocarbonetos poliaromáticos
VOCs	Compostos orgânicos voláteis
RAM	<i>Restrict Acess Material</i>
LOD	Limite de detecção
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
LOQ	Limite de quantificação
RSD	Desvio padrão relativo

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE SIGLAS	viii
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Antidepressivos	2
1.1.1 Antidepressivos Tricíclicos (ADTs).....	5
1.1.2 Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRSs)	10
1.2 Monitorização Terapêutica.....	14
1.3 Métodos Analíticos	15
1.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	37
1.5 Validação Analítica	39
2 OBJETIVOS	45
3 MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1 Materiais.....	47
3.2 Solventes e Reagentes.....	47
3.3 Preparo das Soluções Padrão dos Antidepressivos	48
3.4 Amostras de Plasma	49
3.5 Análises Cromatográficas	49
3.6 Padronização do Método SBSE/HPLC para Análise Simultânea de Antidepressivos	50
3.6.1 Condicionamento das Barras SBSE	50
3.6.2 Avaliação e Otimização dos Parâmetros de SBSE.....	51
3.6.2.1 Otimização do Tempo e Temperatura de extração	51

3.6.2.2 Otimização do pH da Matriz	52
3.6.2.3 Avaliação do efeito da Força Iônica	52
3.6.2.4 Escolha do Modo de Dessorção	52
3.6.2.5 Otimização do Tempo de Dessorção	53
3.7 Validação analítica do método SBSE/HPLC padronizado.....	53
3.7.1 Linearidade	53
3.7.2 Recuperação.....	54
3.7.3 Precisão	54
3.7.4 Limite de Quantificação.....	54
3.7.5 Especificidade	55
4 Resultados e Discussão	57
4.1 Condições Cromatográficas HPLC	57
4.2 Padronização do Método SBSE/HPLC para Análise Simultânea de Antidepressivos	60
4.2.1 Tempo e Temperatura de extração	61
4.2.2 Estudo da Força Iônica.....	65
4.2.3 Estudo do pH.....	67
4.2.4 Modo de Dessorção	69
4.2.5 Tempo de Dessorção	70
4.3 Validação do método SBSE-HPLC padronizado	72
4.3.1 Linearidade	72
4.3.2 Recuperação Relativa.....	77
4.3.3 Precisão Interensaios.....	78
4.3.4 Limite de Quantificação.....	80
4.3.5 Especificidade	81
4.4 Análise de amostras de plasma de pacientes em terapia com antidepressivos	84

5 Considerações Finais 89

REFERÊNCIAS 92

ANEXOS

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Antidepressivos

A depressão endógena tem sido caracterizada por regressão e inatividade, os sintomas mais freqüentes estão relacionados com a perda do apetite, do interesse sexual, insônia e diminuição da atividade motora. O paciente tem se mostrado inútil, abandonado, desesperado e incapacitado para enfrentar as dificuldades do cotidiano. Cerca de 5 a 6 % da população apresenta esta doença e uma fração estimada de 10 a 15% dos indivíduos portadores desse distúrbio evidenciam comportamento suicida durante suas vidas.¹ No entanto, a depressão é sub-diagnosticada e sub-tratada. Muitas vezes, os pacientes deprimidos também não recebem tratamentos suficientemente adequados e específicos.² A morbimortalidade associada à depressão pode ser em boa parte prevenida (em torno de 70%) com o tratamento correto.³

A prevalência da depressão é duas a três vezes mais freqüente em mulheres do que em homens, considerando estudos realizados em diferentes países, em diferentes comunidades e com pacientes que procuram serviços psiquiátricos.⁴

Nos anos 90, a depressão foi estimada como a quarta causa específica de incapacitação, através de uma escala global, para comparação de várias doenças. Para o ano 2020 a depressão está prevista como a primeira causa específica de incapacitação, em países em

desenvolvimento, e a segunda em países desenvolvidos.⁵ Quando comparada às principais condições médicas crônicas, a depressão apresenta equivalência em incapacitação às doenças isquêmicas cardíacas graves.⁶ Em serviços de atenção primária e outros serviços médicos gerais, de 30% a 50% dos casos de depressão não são diagnosticados. Os motivos para o sub-diagnóstico advêm de fatores relacionados a pacientes e médicos, tais como: preconceito por parte dos pacientes em relação ao diagnóstico de depressão e descrença em relação ao tratamento; já os fatores relacionados aos médicos, incluem falta de treinamento e tempo, descrença em relação à eficácia do tratamento, reconhecimento apenas dos sintomas físicos da depressão e identificação dos sintomas de depressão como uma reação "compreensível".¹

Tem-se evidenciado eficácia dos antidepressivos no tratamento agudo das depressões moderadas e graves, porém em depressões leves, a terapia com antidepressivos assemelha-se ao tratamento com placebo.⁷

As diferentes classes de antidepressivos têm eficácia semelhante para a maioria dos pacientes deprimidos, variando em relação aos efeitos adversos e à possibilidade de interação com outros medicamentos, administrados de maneira concomitante.¹ Com relação aos efeitos adversos, os antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs), quando comparado aos tricíclicos, apresentam menor índice de abandono de tratamento, em decorrência de efeitos adversos mais brandos.^{7,8} Existe uma grande variação inter pacientes, com relação

à concentração plasmática de antidepressivos e, portanto, existe uma incerteza em relação a dose adequada.⁷

O modelo predominante na literatura, para o planejamento do tratamento antidepressivo, envolve a fase aguda, de continuação e de manutenção.⁹ A Fase aguda inclui os três primeiros meses e tem como objetivo a diminuição dos sintomas depressivos (resposta). A Fase de continuação vai do quarto ao sexto mês que segue o tratamento agudo e tem como objetivo manter a melhora obtida evitando as recaídas dentro de um mesmo episódio depressivo. Ao final dessa fase, o paciente que permanece com a melhora inicial é considerado recuperado. Já a Fase de manutenção tem como objetivo evitar que novos episódios ocorram (recorrência). Um terço dos pacientes com episódio depressivo com remissão inicial recaem no primeiro ano. O tratamento antidepressivo de continuação por seis meses reduz em 50% o risco de recaída.¹

Os antidepressivos tricíclicos (ADTs) e os inibidores da monoaminoxidase (IMAOs), até os anos 80, eram os únicos utilizados no tratamento da depressão.¹⁰ Embora eficazes e ainda muito utilizados, apresentam efeitos adversos causados pela não especificidade de sua ação farmacológica e, em casos de superdosagem, têm sido potencialmente letais.¹¹ Nas últimas duas décadas, surgiram novas classes de antidepressivos, a partir da pesquisa de moléculas que apresentam menos efeitos adversos que os heterocíclicos. Os antidepressivos de nova geração têm sido classificados em função da ação farmacológica, pois não compartilham estruturas comuns.

1.1.1 Antidepressivos tricíclicos (ADTs)

Os antidepressivos tricíclicos (Figura 1) se dividem em dois grandes grupos: as aminas terciárias (**amitriptilina**, **imipramina**) e as aminas secundárias (**nortriptilina** e **desipramina**). As aminas terciárias recebem esse nome, pois possuem dois grupos metila junto ao átomo de nitrogênio na cadeia lateral, enquanto que as aminas secundárias apenas um grupo metil nesta posição. O mecanismo de ação comum aos antidepressivos tricíclicos, em nível pré-sináptico, baseia-se no bloqueio da recaptação de noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT), e em menor proporção da dopamina (DA), conforme apresentado na Figura 2. Quanto à afinidade apresentada pelos antidepressivos tricíclicos aos diferentes sítios de ligação, observa-se que as aminas terciárias são detectadas nos terminais nervosos serotoninérgicos, em contraste com as secundárias que se ligam com maior afinidade aos noradrenérgicos. Conseqüentemente, na família dos tricíclicos, aminas terciárias, preferencialmente, bloqueiam a recaptação serotoninérgica enquanto que as secundárias bloqueiam a noradrenérgica. Na prática esta distinção é pouco importante, uma vez que, ao se administrarem aminas terciárias, estas são desmetiladas em aminas secundárias havendo assim inibição de recaptação de ambos os tipos de neurotransmissores.¹²

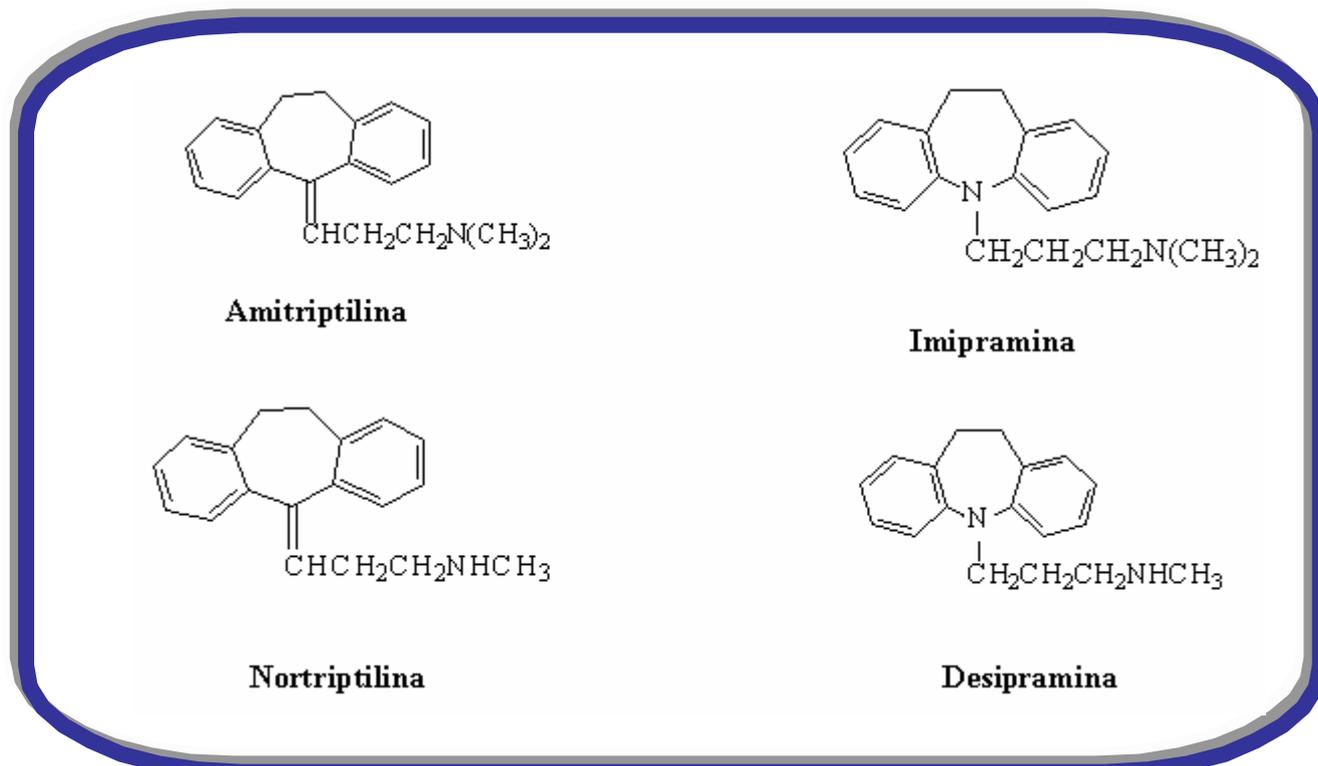


Figura 1 - Estruturas químicas dos antidepressivos tricíclicos (ADTs)

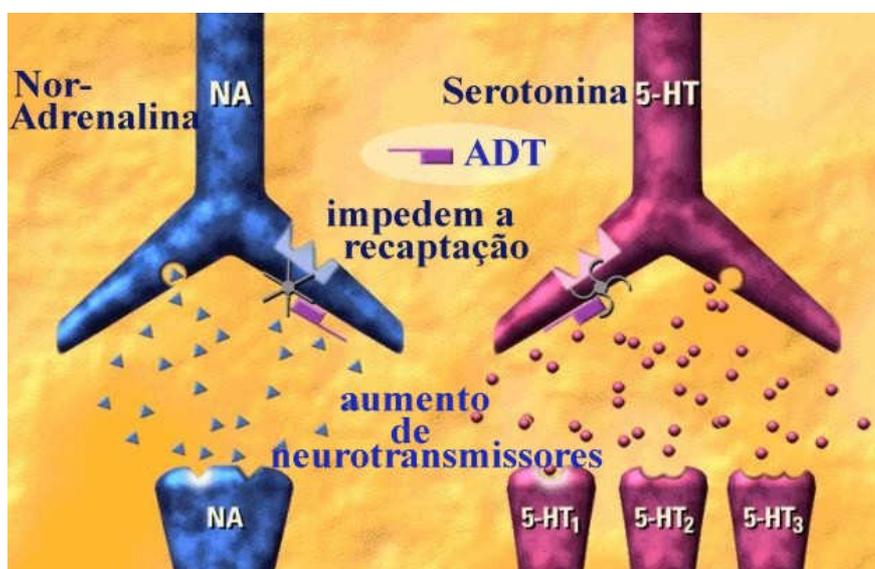


Figura 2 - Ilustração do mecanismo de ação dos ADTs. Inibição da recaptação neural de serotonina (5-HT) e noradrenalina (NA), promovendo um aumento os neurotransmissores na fenda sináptica

A atividade pós-sináptica, geralmente, é responsável pelos efeitos adversos. Os antidepressivos tricíclicos também têm afinidade pelos receptores muscarínicos (colinérgicos), alfa adrenérgicos, histaminérgicos e serotoninérgicos. A ação dos antidepressivos tricíclicos no receptor 5-HT1 contribui para o efeito terapêutico. As Tabelas 1 e 2 ilustram, respectivamente, o efeito dos antidepressivos no bloqueio de receptores e os efeitos adversos consequentes.¹³

Tabela 1 - Efeito dos antidepressivos no bloqueio dos receptores

<i>Antidepressivos</i>	<i>Ach</i>	<i>Alfa-1</i>	<i>H1</i>	<i>5-HT1</i>	<i>5-HT2</i>
Amitriptilina	+++	+++	+	+/-	+
Desipramina	+	+	+	0	+/-
Imipramina	+	+	+	0	+
Nortriptilina	+	+	+	+/-	+

Receptores Ach = colinérgicos; alfa1 = alfadrenérgicos; H = histamínicos tipo 1; 5-HT1 = serotoninérgicos tipo 1; 5-HT2 = serotoninérgicos tipo 2; 0 = sem efeito; +++ = efeito acentuado

Tabela 2 - Efeitos adversos relacionados ao bloqueio de receptores

<i>Anticolinérgicos</i>	<i>Histaminérgicos</i>	<i>Alfa1-adrenérgico</i>	<i>Serotonérgico tipo 2</i>
boca seca	sonolência	hipotensão postural	fadiga
vista turva	sedação	taquicardia	tontura
retenção urinária	ganho de peso	tontura	irritabilidade
constipação	tontura	tremores	disfunções sexuais

Os fármacos tricíclicos têm efeitos significativos sobre o sistema cardiovascular, em superdosagens são altamente cardiotóxicos acarretando hipotensão e taquicardia, podendo ser letal.¹²

Os efeitos terapêuticos exigem um período de latência, no entanto, o mesmo não acontece com os efeitos adversos. Estes aparecem imediatamente após a ingestão do fármaco. Em razão deste fato, um grande número de pacientes tem abandonado o tratamento antes da obtenção dos resultados desejados. Destaca-se desta forma importância da orientação terapêutica ao paciente.¹⁴

Os antidepressivos tricíclicos têm sido prescritos no tratamento da fibromialgia, em doses baixas (menores que as usadas na depressão); a amitriptilina, imipramina e nortriptilina têm sido os mais usados e os que tem apresentado os melhores resultados. Os antidepressivos que inibem especificamente a recaptação de serotonina não têm sido úteis para fibromialgia quando usados isoladamente. Os antidepressivos que bloqueiam os receptores 5HT₂ também tem sido usados no tratamento contra enxaqueca.¹⁴

Os antidepressivos tricíclicos são absorvidos completamente pelo trato gastrointestinal, o pico de concentração plasmática para as aminas terciárias (amitriptilina) tem sido atingido rapidamente (1 a 3 horas) quando comparado às aminas secundárias (desipramina e nortriptilina), 4 a 8 horas. Altamente lipofílicos, concentram-se principalmente no miocárdio e em tecidos cerebrais, ligam-se às proteínas plasmáticas e

sofrem metabolismo primariamente hepático. Muitos antidepressivos tricíclicos apresentam farmacocinética linear, isto é, mudanças na dose administrada levam a alteração proporcional no nível plasmático. A meia vida de eliminação apresenta diferentes valores (por exemplo, imipramina de 4 a 34 horas, amitriptilina de 10 a 46 horas, desipramina de 10 a 62 horas e nortriptilina de 13 a 88 horas). As longas meias vidas permitem que o medicamento seja administrado uma vez ao dia. O estado de equilíbrio é atingido entre 5 e 7 dias. Os tricíclicos levam de 3 a 4 semanas para apresentarem efeitos antidepressivos significativos. As determinações dos níveis plasmáticos, exceto em casos de intoxicação, devem ser realizadas de 8 a 12 horas após a última dose e no estado de equilíbrio, o que certifica uma interpretação exata e segura no ajuste de dosagem. As concentrações plasmáticas terapêuticas recomendadas situam-se em intervalo de 50 a 300 ng mL⁻¹. O início dos efeitos tóxicos pode ser esperado em concentrações plasmáticas acima de 500 ng mL⁻¹ e em níveis acima de 1µg mL⁻¹ podem ser fatais.¹²

Tabela 3 – Intervalo de concentração plasmática dos ADTs propostos como terapêuticos para o controle da depressão¹²

<i>Fármaco</i>	<i>Níveis plasmáticos terapêuticos (ng mL⁻¹)</i>
Amitriptilina	100-250
Desipramina	150-300
Imipramina	150-300
Nortriptilina	50-150

Para melhor evidenciar o nome comercial e a posologia, os dados foram relacionados na Tabela 4.¹²

Tabela 4 – Antidepressivos tricíclicos: nome comercial e posologia

<i>Fármaco</i>	<i>Nome Comercial</i>	<i>Dose (mg/dia)</i>
Amitriptilina	Tryptanol [®]	150-300
Desipramina	Norpramin [®]	150-300
Imipramina	Tofranil [®]	150-300
Nortriptilina	Pamelor [®]	50-150

1.1.2 Inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRSs)

Os ISRSs, ***citalopram e sertralina*** (Figura 3), são tão eficazes quanto os antidepressivos tricíclicos clássicos, mas destituídos dos efeitos adversos associados aos mesmos. Os ISRSs inibem de forma potente e seletiva a recaptção de serotonina. O citalopram e sertralina têm sido eficazes no tratamento de transtornos de ansiedade social, desordem do pânico e da síndrome pré-menstrual. A sertralina também tem sido prescrita no tratamento de distúrbios alimentares, como anorexia nervosa e bulimia nervosa.¹⁵ Embora todos os ISRSs apresentem o mesmo mecanismo de ação, as diferenças entre as estruturas moleculares fazem com que os diferentes compostos apresentem distintos perfis farmacocinéticos. As concentrações plasmáticas de sertralina e citalopram

são proporcionais às doses administradas (farmacocinética linear). As concentrações plasmáticas terapêuticas recomendadas têm sido de 50 a 500 ng mL⁻¹ para a sertralina e 25 a 550 ng mL⁻¹ para citalopram.¹⁶

A sertralina é lentamente absorvida após a administração oral e a taxa de absorção não é afetada pela dose. Contudo, a administração concomitante com alimento acarreta aumento da concentração plasmática, portanto, o fármaco deve ser administrado junto às refeições para assegurar níveis ótimos de absorção. O pico plasmático se dá em cerca de 7 horas após a administração e sua concentração é proporcional à dose. Sua meia-vida é de 26 horas e, como permanece constante, permite a administração em dose única. O estado de equilíbrio plasmático é alcançado em 7 dias. Depois de absorvida, a sertralina é intensamente metabolizada pelo fígado. A desmetilação parcial forma o metabólito primário, desmetilsertralina, um composto clinicamente inativo. Essa amina é, posteriormente, metabolizada a alfa-hidroxi-cetona. Metabólitos conjugados são então excretados pela urina ou bile. A farmacocinética da sertralina não tem sido alterada com a idade do paciente. A sertralina apresenta alguns efeitos adversos, tais como: náuseas (21,2%), cefaléia (18%), diarreia (15,2%), insônia (14,5%), tonturas (13,6%), tremores (11,5%), fadiga (10,9%), agitação (10,6%), sonolência (10,1%) e aumento de peso (4%).^{13,17,18}

O citalopram é rapidamente absorvido após dose oral, alcançando a concentração plasmática máxima em aproximadamente 3 horas (1-6

horas). A absorção não é alterada pela alimentação. Sua biodisponibilidade é de 80% (52 a 90%), com uma absorção quase completa e metabolismo de primeira passagem limitado. O tratamento de dose diária, oral e única, fornece concentrações plasmáticas de equilíbrio estáveis. O estado de equilíbrio é atingido em 1 a 2 semanas e está relacionado linearmente à dose. Não ocorre acúmulo do fármaco, mesmo durante tratamento em longo prazo. A meia-vida é de aproximadamente 35 horas, permitindo dose única. Os metabólitos do citalopram incluem desmetilcitalopram, didesmetilcitalopram, citalopram-N-óxido (ativos) e um derivado desaminado do ácido propiônico (inativo). O metabólito desmetil tem uma meia-vida de 49 horas e o didesmetil, de 102 horas. Os níveis plasmáticos desses compostos são menores quando comparados com os níveis do fármaco original. A atividade farmacológica dos metabólitos é fraca quando comparada à do fármaco. A ligação do citalopram e de seus metabólitos às proteínas plasmáticas é menor que a dos demais psicotrópicos. Sua eliminação ocorre principalmente pela biotransformação no fígado, através de oxidação. O citalopram quando comparado aos demais ISRSs apresenta pequenas modificações nos parâmetros farmacocinéticos quando administrados com outros fármacos. É o único ISRSs avaliado para tratamento intravenoso. Em pacientes idosos, a meia-vida é mais longa e os níveis de depuração são mais baixos, indicando uma atividade metabólica menor, devendo a dose ser ajustada. Os efeitos adversos são brandos, pouco frequentes e são caracterizados por náuseas, xerostomia, sonolência, aumento da sudorese

e tremores, pequena redução na frequência cardíaca e não estão associados ao aumento do peso ou do apetite. Estes efeitos tendem a diminuir em frequência e intensidade, depois de poucas semanas de tratamento.^{13,15,17,19}

Para melhor evidenciar o nome comercial dos antidepressivos ISRSs e a posologia, os dados foram relacionados na Tabela 5.

Tabela 5 – Antidepressivos ISRSs: nome comercial e posologia

<i>Fármaco</i>	<i>Nome Comercial</i>	<i>Dose (mg/dia)</i>
Citalopram	Cittá [®]	20-60
Sertralina	Assert [®]	50-200

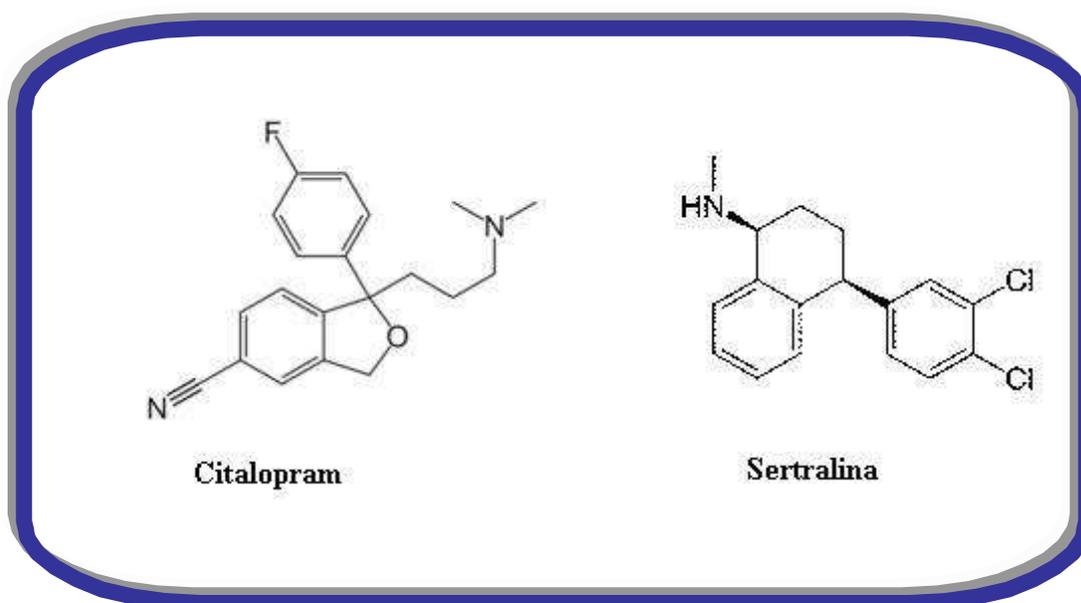


Figura 3 - Estruturas química dos antidepressivos ISRSs

1.2 Monitorização terapêutica²⁰⁻²¹

A monitorização terapêutica (TDM^a) tem sido considerada como uma ferramenta para otimizar o regime de dosagem de fármacos, 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 de farmacocinética. O objetivo da monitorização terapêutica é assegurar a eficácia e minimizar os efeitos adversos dos fármacos, prescritos na clínica. Os fármacos monitorados têm sido aqueles que apresentam intervalos terapêuticos bem estabelecidos, ou seja, a maioria dos pacientes, que apresentam concentrações plasmáticas dentro deste intervalo fixo, tem as desordens psiquiátricas mantidas sob controle e efeitos adversos aceitáveis. A monitorização terapêutica também tem sido aplicada a fármacos com faixa terapêutica estreita, alta variabilidade interindividual na farmacocinética e resposta clínica não facilmente ou não imediatamente mensurável.

A aplicação clínica da monitorização terapêutica tem sido indicada em situações nas quais eficácia do medicamento é questionada, quando o paciente apresenta sintomas de toxicidade relacionados ao fármaco, quando há suspeita de não aderência do paciente ao regime de dosagem estabelecido, nas situações de interações medicamentosas, nas patologias associadas capazes de alterar a distribuição do fármaco, nas situações de

^a do inglês: therapeutic drug monitoring

mudanças na formulação ou ainda quando a condição do paciente é refratária ao regime de dosagem convencional.

1.3 Métodos analíticos

O tratamento prévio de amostras biológicas, o qual abrange as etapas de extração, pré-concentração e "clean-up"^a, tem sido requerido nas análises de fármacos, para aumentar a seletividade do método analítico.

A extração líquido-líquido e a extração em fase sólida têm sido os métodos convencionais mais empregados no pré-tratamento de amostras biológicas para análises cromatográficas de antidepressivos²²⁻²⁶ (Tabela 6).

A extração líquido-líquido (**LLE^b**), a qual é uma técnica simples, tem sido largamente empregada, e é caracterizada pelo contato de dois líquidos imiscíveis, os quais representam duas fases²⁷. Nessa situação, os analitos inicialmente solubilizados em uma das fases, em função do movimento dinâmico (geralmente agitação mecânica horizontal) e à temperatura constante, tendem a se solubilizarem em ambas as fases. Desse modo, duas soluções imiscíveis são formadas, porém cada uma delas homogênea. Após atingir o equilíbrio de partição dos analitos entre as diferentes fases, as concentrações dos analitos permanecem constantes. Nesse momento, se uma das fases for removida e substituída pela mesma fase pura e o sistema for deixado atingir o equilíbrio, as

^a do inglês: limpeza

^b do inglês: liquid-liquid extraction

concentrações do analito, nas duas soluções serão diferentes, porém suas relações permanecerão constantes. Este valor constante é chamado de coeficiente de partição ou coeficiente de distribuição (K).²⁸⁻²⁹

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

Tabela 6 - Métodos convencionais de preparo de amostras biológicas para análise cromatográfica de antidepressivos

<i>Analito</i>	<i>Matriz</i>	<i>Método de Extração e Detecção</i>	<i>Recuperação</i>	<i>Ref.</i>
Amitriptilina Nortriptilina Imipramina Desipramina Clomipramina	plasma soro	LLE hexano, pH 11 HPLC-UV	92-105%	22
Sertralina	Plasma	LLE, pH alcalino após desproteínização e perfluoroacetilação com HFBA ^a GC-MS (SIM)	80-85%	23
Sertralina, Citalopram, Amitriptilina Nortriptilina Imipramina Desipramina Clomipramina	Plasma soro	SPE – C ₁₈ HPLC-UV	75-99%	24
Sertralina	plasma	SPE C ₂ HPLC-UV	> 90%	25
Citalopram	plasma	SPE, C ₁₈ HPLC-MS/ESI ^b	> 95%	26

^a HFBA: ácido heptafluorobutírico ^bHPLC-MS/ESI: cromatografia líquida de alta eficiência-espectrometria de massa/ionização por eletro-spray.

A extração em fase sólida (**SPE^a**) é uma técnica de separação líquido-sólido baseada no mecanismo de separação da cromatografia líquida clássica, a qual utiliza cartuchos de extração que contêm a fase sólida. A solução contendo o analito é colocada no topo do cartucho e depois de drenada a fase líquida, o analito retido no cartucho é eluído com um pequeno volume de solvente.³⁰ A SPE 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, essa técnica apresenta algumas limitações como o bloqueio dos poros da fase extratora pelos componentes da matriz, a utilização de solventes orgânicos para a eluição, variações analíticas entre cartuchos extratores, várias etapas operacionais para sua execução.³¹⁻³²

A miniaturização das técnicas tem sido uma tendência em química analítica. No final da década de 90, Pawliszyn e colaboradores (1997)³³ desenvolveram a técnica de microextração em fase sólida (**SPME^b**). A microextração em fase sólida apresenta uma série de vantagens em relação aos métodos de extração anteriormente referidos, ou seja, não requer instrumentação analítica sofisticada, não utiliza solvente orgânico quando utilizada junto à cromatografia gasosa, ou utiliza pouco solvente orgânico junto à cromatografia líquida, possui processo operacional

^a do inglês: solid phase extraction

^b do inglês: solid-phase microextraction

rápido, permite automação das análises e a reutilização das fibras extratoras, e integra em um único sistema, a extração, concentração e introdução da amostra no sistema cromatográfico.^{31,32,34} O dispositivo para SPME consiste de um amostrador (uma espécie de seringa) com uma fibra de sílica fundida revestida com um fino filme de um polímero ou de um adsorvente sólido (fase estacionária), como ilustrado nas Figuras 4 e 5.

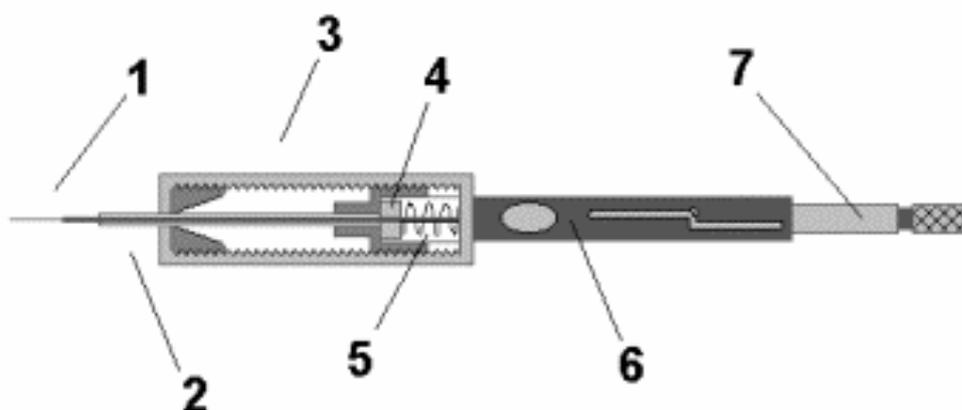


Figura 4 - Dispositivo comercial para SPME: **1:** Fibra extratora, **2:** agulha de aço, **3:** Corpo do aplicador, **4:** Septo de silicone, **5:** Guia do aplicador, **6:** Guia do êmbolo, **7:** Êmbolo

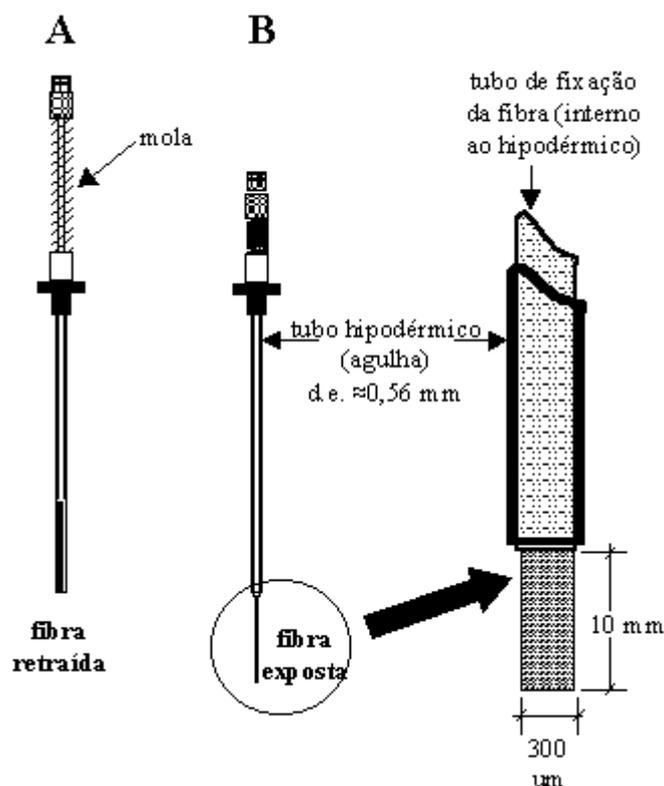


Figura 5 - Dispositivo da fibra de SPME: **(A)** Posição da fibra retraída na agulha (tubo de diâmetro externo 0,56 mm), **(B)** Posição com a fibra exposta

A SPME é um processo de equilíbrio entre três fases: a aquosa (amostra), a polimérica (fibra) e a gasosa. Durante a extração, 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. A massa total do analito deverá permanecer constante durante a extração, podendo ser expressa pela equação 1:

$$C_o V_s = C_f^e V_f + C_h^e V_h + C_s^e V_s$$

Equação 1

Na qual C_o indica a concentração inicial do analito na amostra, C_f^e , C_h^e , C_s^e as concentrações no estado de equilíbrio nas fases polimérica, gasosa e na aquosa (amostra), respectivamente. V_f , V_h , V_s os volumes das fases polimérica, gasosa e aquosa, respectivamente.

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

$$K_{fh} = C_f^e / C_h^e$$

$$K_{hs} = C_h^e / C_s^e$$

E a massa do analito absorvido ou adsorvido pela fase polimérica por:

$$n = C_f^e V_f$$

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

$$n = \frac{K_{fh} k_{hs} V_f V_s C_o}{K_{fh} k_{hs} V_f + K_{hs} V_h + V_s}$$

Equação 2

A quantidade do analito absorvido pela fibra está linearmente relacionada com a concentração inicial do analito presente na amostra, permitindo assim análises quantitativas.³⁵

Os dois principais modos para a SPME têm sido a extração direta e a extração na fase gasosa. A seleção do modo de extração depende da composição da amostra e da volatilidade do analito. No modo direto, o revestimento da fibra é inserido diretamente à amostra e os analitos através do processo de difusão são transportados da amostra para a fase extratora, já na extração na fase gasosa, ou no *headspace* do frasco

ocorre partição dos analitos voláteis entre a fase gasosa e a matriz da amostra. Esse modo protege a fibra de possíveis danos causados pela adsorção irreversível de interferentes de elevada massa molecular presentes na amostra, como por exemplo, proteínas (amostra biológica). Nos dois modos de extração a agitação é requerida para acelerar o processo de difusão do analito da amostra para a fase extratora. Além da escolha do revestimento da fibra, a eficiência da extração é influenciada por diversos parâmetros, os quais devem ser otimizados: tempo e temperatura de extração, pH, velocidade de agitação, força iônica do meio, tempo e temperatura de dessorção.³⁶

O processo de SPME (Figura 6a) consiste de duas etapas: a extração dos analitos por meio de processo de partição desses entre as fases aquosa (amostra) e estacionária (fibra), e a dessorção dos analitos da fibra para o equipamento analítico. Na primeira etapa, a fibra revestida por um polímero ou sólido adsorvente (fase estacionária) é exposta à amostra, e os analitos são extraídos de acordo com suas constantes termodinâmicas de partição.^{31,32} A etapa subsequente representa a dessorção dos analitos sorvidos na fase extratora para o sistema cromatográfico, onde esses serão separados, identificados e quantificados. Em análises realizadas por cromatografia gasosa (SPME-GC^a, Figura 6b), a fibra é inserida no injetor aquecido e os analitos são termicamente dessorvidos de forma rápida para a coluna cromatográfica. Quando cromatografia líquida é a técnica analítica em uso, o processo de dessorção requer uma interface apropriada, em

^a do inglês: solid-phase microextraction-gas chromatography

forma de um T, onde a fibra é inserida na extremidade superior e as demais extremidades, lateral e inferior, são conectadas à válvula Rheodyne do HPLC (SPME-HPLC^b, Figura 6c). A dessorção dos analitos poderá ser realizada no modo dinâmico, com a fase móvel; ou modo estático, quando os analitos são fortemente absorvidos pela fibra. Neste último modo, a fibra, anterior a eluição dos analitos para a coluna cromatográfica, permanece na interface em contato com um volume predeterminado de fase móvel ou de solvente orgânico durante um intervalo de tempo, para dessorção dos analitos.^{33,37,38}

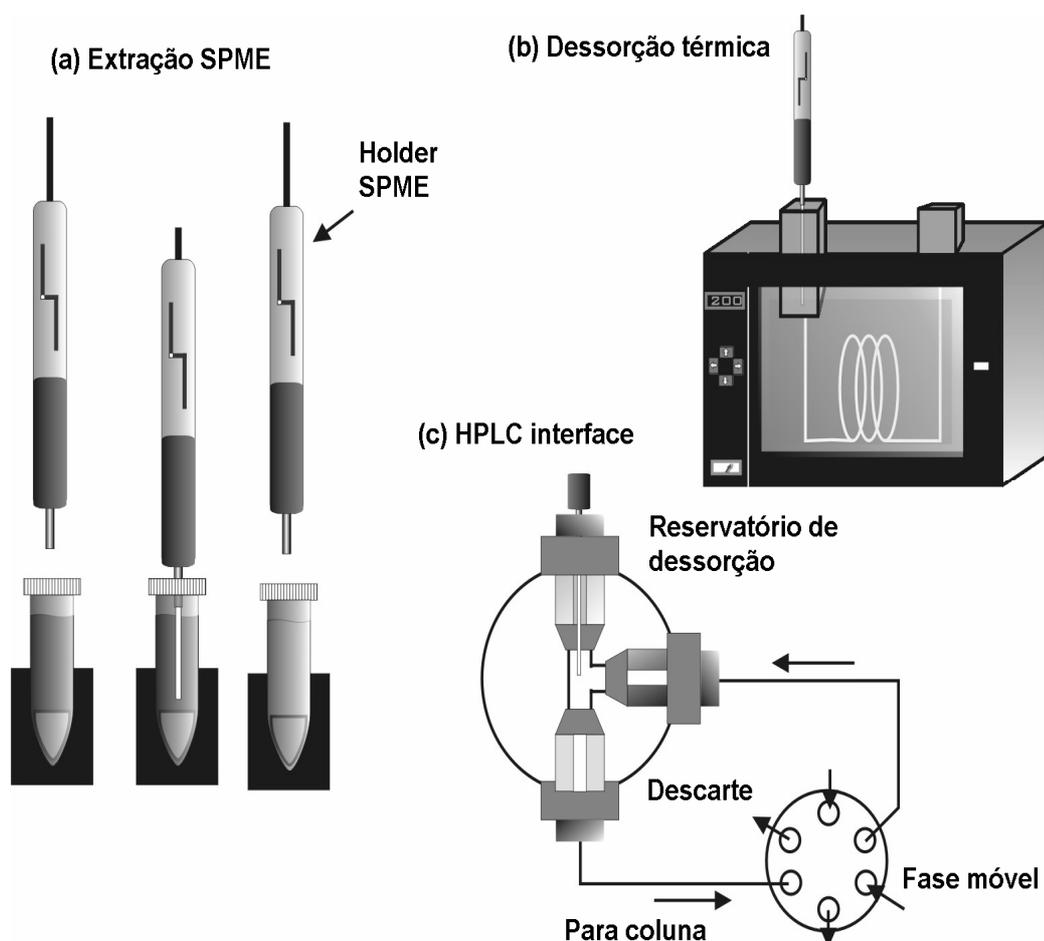


Figura 6 - (a) Processo de extração SPME, (b) Processo de dessorção térmica SPME-GC, (c): Processo de dessorção SPME-HPLC

^b do inglês: solid-phase microextraction- high performance liquid chromatography

A técnica SPME-GC, inicialmente desenvolvida para a análise de poluentes em amostras ambientais,³⁹⁻⁴² tem sido empregada com êxito na extração de fármacos voláteis e semivoláteis em análises de amostras biológicas,^{43,44} principalmente quando analisados no modo "headspace",³¹ no qual 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-GC ou empregando a técnica SPME-HPLC.

A fibra de SPME revestida com polidimetilsiloxano (PDMS), devido à sua estabilidade, tem sido a mais utilizada. Essa, quando revestida com 100 µm de PDMS resulta em aproximadamente 0,5 µL de fase extratora. Conseqüentemente, a eficiência da extração para fármacos parcialmente solúveis em água pode ser bem baixa.⁴⁵ Para compostos muito apolares ocorrerá a distribuição dos analitos entre a fase aquosa, a fase extratora da fibra de SPME, a parede de vidro do frasco de extração, e a superfície do politetrafluoroetileno da barra magnética usada para agitar as amostras.^{46,47}

Baseando-se nestas observações, Pat Sandra e colaboradores⁴⁸ desenvolveram uma nova técnica de preparo de amostra. A barra de agitação foi revestida com uma espessa camada de PDMS e usada para agitar as amostras aquosas, desse modo, os analitos foram sorvidos no revestimento de PDMS. Esta técnica foi denominada de **extração sortiva em barra de agitação (SBSE^a)**.⁴⁸ A fase PDMS é inerte e termoestável

^a do inglês: stir bar sorptive extraction

e, pode ser usada em larga escala de temperatura (-20°C a 320°C).³⁴ A interação do PDMS com o analito é de partição e não de adsorção. Devido à fraca interação com o analito, os compostos podem ser dessorvidos a temperaturas mais baixas, minimizando a perda de solutos termolábeis.^{48,49} Esta fase extratora (PDMS) é a mesma fase usada nas fibras SPME, no entanto a quantidade de revestimento utilizada é de 50 a 250 vezes maior, o que resulta em taxas de recuperação mais elevadas e maior capacidade de amostra.

Para SPME, o volume do PDMS é de aproximadamente 0,5 µL. Isso resulta em recuperações não eficientes para analitos com baixos valores de coeficiente de distribuição octanol/água ($K_{o/w}$). Na extração sortiva em barra de agitação, são usados revestimentos de PDMS de 25 a 125 µL. Conseqüentemente, a sensibilidade analítica é aumentada de 50 a 250 vezes. A eficiência da extração, teoricamente alcança 100% para solutos com valores de $K_{o/w}$ maiores que 500.³⁴

As barras magnéticas SBSE disponíveis no comércio são revestidas com PDMS, procedentes da Gerstel GmbH (Müllheim Ruhr, Germany). Estas barras SBSE apresentam uma haste magnética, necessária para agitar a solução da amostra, inserida no interior de um tubo vidro fino, o qual é recoberto por uma camada de polidimetilsiloxano de 1mm de espessura, para sorção dos analitos. O revestimento de vidro é essencial para a alta qualidade da barra de agitação, pois impede a decomposição da camada de PDMS pelo metal da haste metálica (Figura 7).

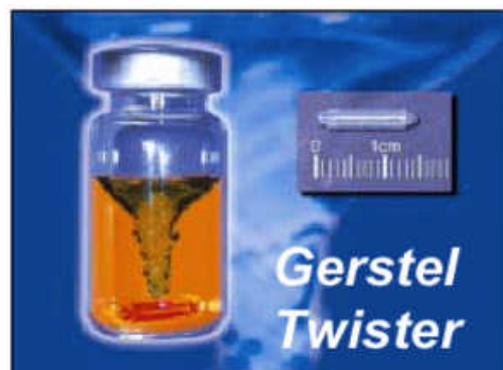


Figura 7 - Barras magnéticas SBSE revestidas com PDMS, procedentes da Gerstel. Retirada do site www.gerstel.com

A SBSE é uma técnica de equilíbrio, não exaustiva, na qual a extração dos analitos presentes em amostras aquosas é controlada pelo coeficiente de partição dos analitos entre as fases PDMS e aquosa. Baltussen et al.⁴⁸ têm correlacionado o coeficiente de partição dos analitos com os coeficientes de distribuição octanol-água ($K_{o/w}$).

O equilíbrio de sorção é dependente da razão entre as fases, assim como da quantidade de PDMS no revestimento (equação 1).

$$\begin{aligned}
 K_{o/w} &\approx K_{PDMS/w} = \frac{C_{PDMS}}{C_w} \\
 &= \left(\frac{m_{PDMS}}{m_w} \right) \left(\frac{V_w}{V_{PDMS}} \right) \quad \text{Equação [1]} \\
 &= \beta \left(\frac{m_{PDMS}}{m_w} \right)
 \end{aligned}$$

O coeficiente de distribuição entre as fases PDMS e a aquosa ($K_{PDMS/w}$) é definido como a razão entre a concentração do analito na fase

PDMS (C_{PDMS}) e a concentração na fase aquosa (C_w) no equilíbrio. Essa razão é igual à razão da massa do analito na fase PDMS (m_{PDMS}) e massa do analito na fase aqueosa (m_w) multiplicado por β , (sendo $\beta = V_w/V_{PDMS}$).

A eficiência da extração, ou seja, a razão entre a quantidade extraída do analito (m_{PDMS}) e a quantidade inicial do analito na fase aquosa ($m_o = m_w + m_{PDMS}$), é dependente do coeficiente de distribuição $K_{PDMS/w}$ e β como descrito na equação 2.

$$\frac{m_{PDMS}}{m_o} = \frac{\left(\frac{K_{PDMS/w}}{\beta}\right)}{1 + \left(\frac{K_{PDMS/w}}{\beta}\right)} \quad \text{Equação [2]}$$

Segundo esta equação, a eficiência da extração aumenta com aumento de $K_{PDMS/w}$, pois $K_{PDMS/w}$ é similar ao coeficiente de distribuição octanol-água ($K_{o/w}$). Além da razão $K_{PDMS/w}$, β (volume da amostra/volume PDMS) é também importante. Quanto maior a quantidade do PDMS, menor é o β e maior a eficiência da extração.

A Figura 8 relaciona o coeficiente de partição octanol-água com a eficiência dos processos SBSE e SPME.

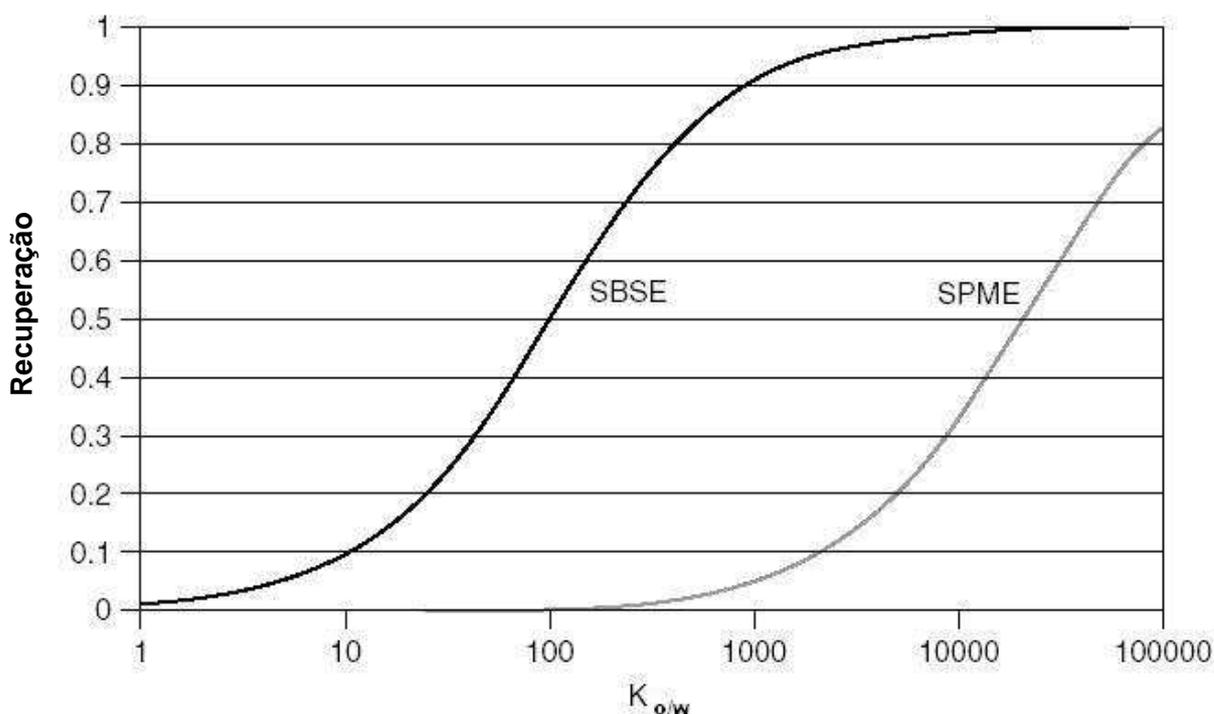


Figura 8 - Recuperação de solutos em função do coeficiente de partição octanol-água ($K_{o/w}$) para as técnicas, SPME (10 mL amostra, fibra PDMS, 100 μ m de espessura) e SBSE (10 mL amostra, camada de PDMS 10 mm x 0,5 mm) ³⁴

Segundo a Figura 8, a eficiência da técnica SBSE aproxima-se a 100% para solutos com valores de $K_{o/w}$ maiores que 500, enquanto que a técnica SPME apresenta satisfatória eficiência para solutos com $K_{o/w}$ maiores que 10^5 .

A extração sortiva pela barra de agitação de uma amostra líquida tem sido realizada colocando-se uma quantidade apropriada de amostra em um frasco de vidro ou tubo de extração (Figura 9). A barra de agitação revestida com PDMS é adicionada à amostra e agitada durante um intervalo de tempo de 30 a 240 minutos. O tempo da extração tem sido determinado pelo volume de amostra, velocidade de agitação, dimensões da barra de agitação (comprimento da barra). A otimização é realizada

avaliando a recuperação do analito em função do tempo de extração. As melhores condições são obtidas quando as taxas de recuperação permanecem constantes com o aumento do tempo da extração. Após a extração, a barra de agitação é removida da amostra aquosa e seca em papel limpo para remover as gotas de água. Em alguns casos, é recomendado enxaguar a barra de agitação ligeiramente com água Milli-Q para remover os açúcares adsorvidos, proteínas, ou outros componentes da amostra. Enxaguar não causa a perda do analito, pois os mesmos estão solubilizados no interior da fase extratora.³⁴

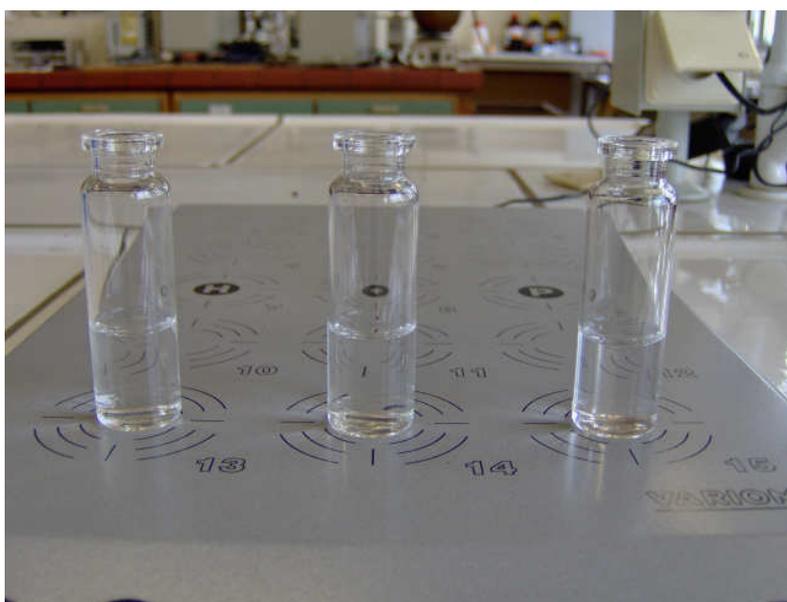


Figura 9 - Processo SBSE

Simalgándara e colaboradores⁵⁰ avaliaram a influência dos parâmetros: adição de acetonitrila, temperatura de extração, adição de sal, tempo de extração e de dessorção no processo SBSE, para a determinação de poliaromáticos (PAHs) em água. Os resultados

mostraram que a adição de acetonitrila em concentrações menores que 10% aumentou a eficiência da extração, provavelmente por ter diminuído a adsorção dos PHAs no frasco de vidro, já a adição de acetonitrila em concentrações maiores que 10% diminuiu a eficiência da extração, provavelmente, devido ao aumento da solubilidade dos PAHs em ACN:H₂O e redução da afinidade dos PAHs pela fase PDMS. A adição de sal, reduziu a eficiência da extração. As temperaturas mais altas favoreceram o processo SBSE, pois aumentaram a cinética da extração.⁵⁰

Para a análise de compostos voláteis ou semivoláteis tem sido usada a dessorção térmica (TD^a), realizada em tubo de vidro acoplado em linha com GC (Figura 10). Como no processo SBSE utiliza-se mais fase extratora PDMS, a dessorção requer maior tempo, quando comparada ao processo SPME. Os solutos são dessorvidos termicamente (GC, 150 a 300°C), a temperatura de dessorção está correlacionada à volatilidade dos solutos. O tempo de dessorção normalmente utilizado tem sido de 5 a 15 minutos.

^a do inglês: thermal desorption

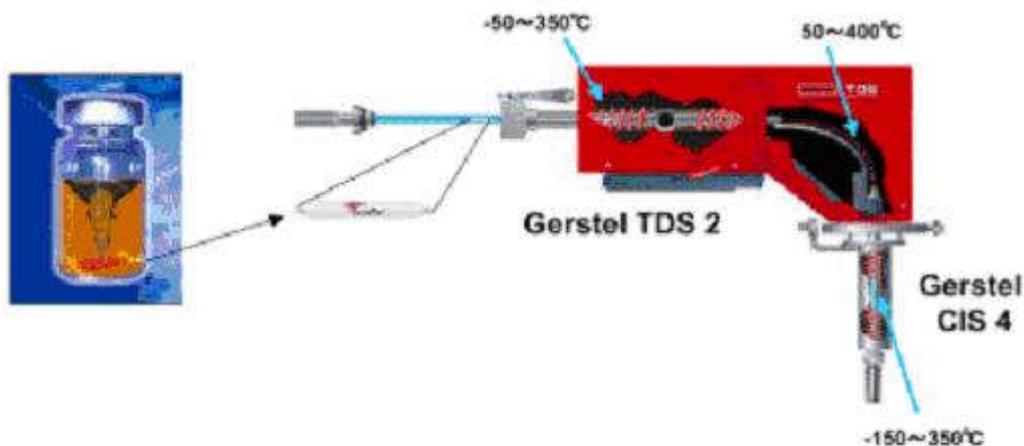


Figura 10 - Dessorção Térmica SBSE-GC. Retirada do site www.gerstel.com

Outra alternativa tem sido a dessorção em fase líquida (Figura 11), em solventes adequados (geralmente em banho de ultra-som), com as alíquotas do extrato sendo analisadas por GC ou HPLC. A combinação da SBSE com dessorção líquida, SBSE-HPLC, tem sido utilizada para análise de compostos com alta massa molecular ou de solutos termolábeis.⁵¹ A dessorção em fase líquida deverá ser melhor estudada porque possibilita análise de compostos polares que não podem ser analisados em CG.⁴⁹ O processo SBSE-HPLC foi utilizado para a análise de fungicidas em amostras de uvas resultando em limites de quantificação de $0,01 \text{ mg Kg}^{-1}$ para todos os fungicidas analisados.⁵²

A SBSE também pode ser realizada no "headspace" de um líquido⁵³(Figura 12).

As barras de agitação PDMS têm sido re-utilizadas (aproximadamente 30 vezes), após o processo de dessorção térmica, sem processos de "clean up" ou de condicionamento adicionais.⁵⁴⁻⁵⁶

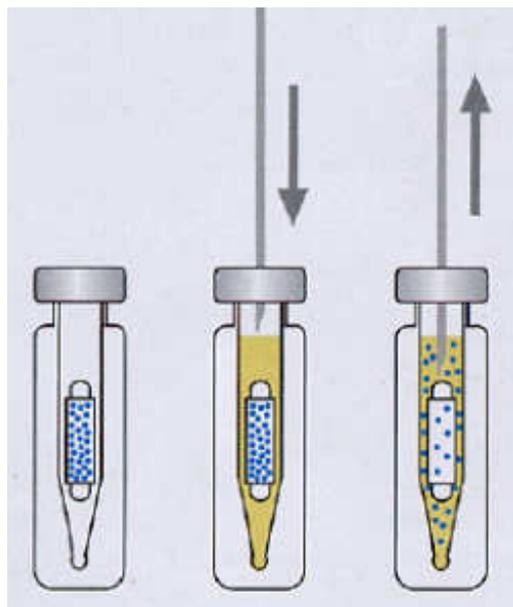


Figura 11 - Dessorção SBSE-LC "off-line"



Figura 12 - SBSE no *headspace*. Retirada do site www.gerstel.com

A técnica SBSE tem apresentado alta sensibilidade analítica quando aplicada à área ambiental (Tabela 7), para as análises de compostos aromáticos voláteis, solventes halogenados⁴⁸⁻⁵³, hidrocarbonetos

poliaromáticos^{54,57}, bifenilas policloradas (PCBs)⁵⁸, pesticidas, flavorizantes^{59,60}, composto de organo-estanho⁶¹ e fenóis.⁶²

Outras aplicações bem sucedidas da técnica SBSE têm sido as determinações de flavorizantes, conservantes e pesticidas em diferentes matrizes alimentícias (Tabela 7), incluindo bebidas alcoólicas e não alcoólicas.^{55,63-67}

A SBSE com processo de derivatização tem sido utilizada para a análise do ácido p-aminohipúrico, um composto tóxico presente na urina, relacionado à disfunção renal,⁵¹ para análise de fenóis,⁶² e para a determinação de compostos orgânicos em flúidos biológicos.³⁴ A derivatização e processo SBSE têm sido realizados simultaneamente, a extração com a barra PDMS tem sido efetuada após a adição dos reagentes derivatizantes.

Tabela 7 - Aplicações da técnica SBSE nas áreas ambiental e alimentícia

<i>Analitos</i>	<i>Matriz</i>	<i>Limite de Detecção</i>	<i>Método</i>	<i>Ref.</i>
VOCs	água	1 ng L ⁻¹	GC-MS modo monitoramento de íon selecionado	48
VOCs	água	1 µg L ⁻¹	GC-MS modo varredura	53
PAHs	água	0,2-2 ng L ⁻¹	SBSE - dessorção líquida-HPLC, detector fluorescência	54
PAHs	água	0,1-2 ng L ⁻¹	SBSE - dessorção térmica-GC-MS	57
Flavorizantes	água	0,1-1 ng L ⁻¹	SBSE-dessorção térmica-GC-MS	60
Organo-estânho	água	0,1 ng L ⁻¹	SBSE-dessorção térmica-GC-MS	61
Pesticidas	vinho	1 ng L ⁻¹	SBSE-dessorção térmica-GC-MS	66
Pesticidas	Polpa de pêra	10 µg Kg ⁻¹	SBSE dessorção térmica-GC-MS	67
Pesticidas	Frutas e vegetais	10 µg Kg ⁻¹	SBSE dessorção térmica-GC-MS	64
Fungicidas	vinho	2 ng L ⁻¹	SBSE-dessorção térmica-GC-MS (modo monitoramento de íon selecionado) e SBSE-dessorção líquida-LC-MS (modo monitoramento de íon selecionado)	65

VOCs: compostos orgânicos voláteis, PHAs: hidrocarbonetos poliaromáticos

Diferentes analitos como: fenóis, esteróides, ácidos graxos, drogas do abuso,⁵¹ benzodiazepínicos,⁶⁸ ftalatos e metabólitos,⁶⁹ compostos orgânicos voláteis (VOCs), tais como aldeídos e compostos de enxofre,⁷⁰ metabólitos de hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs)⁷¹ e barbitúricos⁷² têm sido extraídos de soro, plasma ou urina e bifenilas policloradas (PCBs) no esperma⁷³ (Tabela 8).

As amostras de urina têm sido extraídas diretamente ou após hidrólise enzimática. Amostras de soro, plasma, líquidos da bile e esperma têm sido diluídas com água ou com solução tampão³⁴ e proteínas do plasma tem sido precipitadas antes do processo de extração.⁷⁴

Lambert et al. (2005)⁷⁵ desenvolveram uma barra de SBSE revestida com alquil-diol sílica (ADS), material de acesso restrito (RAM), para solucionar o problema das interferências das proteínas no processo de extração. As partículas ADS possuem superfície exterior hidrofílica e eletricamente-neutra (diol) dificultando a adsorção das proteínas e a superfície interna (fase ligada, alquil hidrofóbica, C₁₈) responsável pela extração dos analitos. Dessa forma, as partículas ADS são capazes de fracionar a amostra em matriz protéica e analito, através do controle do tamanho de seus poros, os quais formam uma barreira excluindo as macromoléculas. Simultaneamente ao processo de exclusão pelo tamanho, compostos com moléculas de baixa massa molecular são extraídas e enriquecidas, via partição, na fase interior (C₁₈). A SBSE-RAM foi utilizada nas análises de cafeína e seus metabólitos em fluidos biológicos, resultando em limite de detecção de 25 ng mL⁻¹.⁷⁵

Tabela 8 - Aplicações da técnica SBSE para análises de fluidos biológicos

Referência	Analito e Matriz	Condições de extração	Deteção	LOD ^A	Observações
Tienpont <i>et al.</i> (2002) ⁵¹	Marcadores biológicos, drogas de abuso em fluidos biológicos	60 min 1000 rpm	TD-CG-MS	DEHP ^B 0.3 µg L ⁻¹	Derivatização com <i>ethyl chloroformate</i> e ácido anidrido acético
Benijts <i>et al.</i> (2001) ⁷³	Bifenilas policloradas em esperma humano	45 min 1000 rpm	TD-CG-MS ^C	< pg mL ⁻¹	Amostra diluída (esperma: água/metanol (1:9 v/v) ^D
Tienpont <i>et al.</i> (2003) ⁷²	Fármacos em urina	60 min a 1000 rpm	TD-CG-MS	Barbitúricos 1 µg L ⁻¹	Derivatização com <i>ethyl chloroformate</i> e ác. anidrido acético
Lambert <i>et al.</i> (2005) ⁷⁵	Cafeína e metabolitos em plasma	30 min 1000 rpm	HPLC-UV	25 ng mL ⁻¹	Dessorção líquida ADS-RAM-como revestimento SBSE ^E
Kawasguchi <i>et al.</i> (2004) ⁷⁶	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> (2004) ⁷⁷	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 ¹ Plasma 20 pg mL ⁻¹ Saliva	Amostra com pH ajustado (pH 10.5) Derivatização <i>in situ</i>
Stopforth <i>et al.</i> (2005) ⁷⁸	Ácido tuberculo 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

continuação da tabela 8...

...continuação da tabela 8

Referência	Analito e Matriz	Condições de extração	Deteccção	LOD ^A	Observações
Kawaguchi <i>et al.</i> (2005) ⁷⁹	Xenoestrógenos fenólicos em urina humana	150 min 1000 rpm	TD-CG-MS	10-50 pg mL ⁻¹	Derivatização com ácido anidrido acético
Kawaguchi <i>et al.</i> (2005) ⁸⁰	Clorofenóis em urina	60 min, 500 rpm	TD-CG-MS	10- 20 pg mL ⁻¹	Conjugação enzimática e derivatização com ácido anidrido acético
ALMEIDA e NOGUEIRA, (2006) ⁸¹	Hormônios sexuais em urina	120-240 min 750 rpm)	LD-HPLC-DAD ^F	0,3-1,0 µg L ⁻¹	Dessorção Líquida em 1;5 mL solvente no ultra-som
Stopforth <i>et al.</i> (2006) ⁸²	4-HNE ^G (produto da peroxidação lipídica) em urina	50 min 1100 rpm	TD-GC-MS	22 pg mL ⁻¹	2 etapas de derivatização <i>in situ</i> com PFBHA ^H e no <i>headspace</i> com anidrido acético

^A LOD: limite de deteção. ^B DEHP: Di-(2-etilhexil)ftalato. ^C TD-GC-MS: dessorção térmica-cromatografia gasosa-espectrometria de massa. ^D Metanol foi adicionado a solução da amostra para minimizar o efeito da adsorção pelo vidro. ^E ADS-RAM: alquil-diol-silica, material de acesso restrito. ^F LD-HPLC-DAD: dessorção líquida-cromatografia líquida de alta eficiência-detector com arranjo de diodo. ^G 4-HNE: 4-hydroxynonenal. ^H PFBHA: pentafluorobenzil hidroxilamina.

A análise dos trabalhos apresentados demonstrou que a técnica SBSE-HPLC deverá ser melhor investigada cientificamente, pois as evidências quanto à sua aplicabilidade para análises de fármacos em amostras biológicas, para fins de monitorização terapêutica, parecem inquestionáveis, porém ainda não demonstradas na prática. No Brasil, nosso grupo é pioneiro no estudo da aplicação de SBSE para determinação de fármacos.⁸³

1.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia ocupa um lugar de destaque entre as técnicas analíticas disponíveis para a separação e quantificação de espécies químicas. Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), "a cromatografia é a técnica usada para a separação dos componentes de uma amostra, os quais se distribuem em duas fases, uma estacionária e a outra, móvel. A fase estacionária pode ser um sólido ou um gel. A fase móvel pode ser líquida ou gasosa.⁸⁴ A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Figura 13) é o termo geralmente empregado para descrever a separação diferencial de solutos em um fluxo líquido (fase móvel) através de uma coluna preenchida com partículas sólidas (fase estacionária).

A HPLC é considerada uma técnica complementar à cromatografia gasosa (GC). Espécies não voláteis e/ou termicamente instáveis não podem ser analisadas por GC, a menos que essas sofram um processo de derivatização que as tornem mais voláteis e/ou termicamente estáveis. Outra alternativa seria a análise desses compostos não derivatizados por HPLC. Além disso, a técnica de HPLC apresenta uma série de outras vantagens como: rapidez nos resultados, alta resolução, versatilidade, podendo analisar moléculas de alta massa molecular, espécies iônicas ou não iônicas.^{27,84,85} A técnica HPLC pode ser classificada de acordo com o mecanismo de separação. Em cromatografia líquida em fase ligada, a fase estacionária é ligada quimicamente à superfície de um suporte sólido, geralmente, sílica. As partículas de sílica (ligadas à fase estacionária) são

compactadas por meio de técnicas especiais (*slurry packing*) em colunas de aço inoxidável. As colunas analíticas convencionais apresentam diâmetros internos entre 2 e 4,6 mm e comprimentos que variam de 10 a 25 cm.⁸⁴⁻⁸⁵ De acordo com as polaridades relativas das fases, móvel e estacionária, pode-se dividir a cromatografia em fase ligada em dois tipos: modo normal, no qual a fase estacionária é polar e a fase móvel é apolar e modo reverso, no qual a fase estacionária apolar e fase móvel polar.

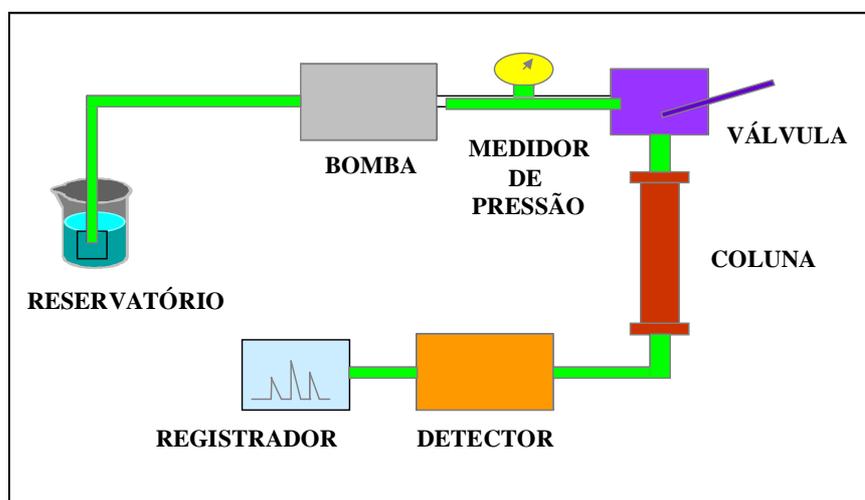


Figura 13 - Esquema dos componentes de um sistema de HPLC

A cromatografia em fase reversa é a modalidade em HPLC mais utilizada, uma vez que permite a separação de uma grande variedade de solutos e o uso de fases móveis aquosas. A fase móvel mais utilizada é a mistura de acetonitrila e água, sendo a acetonitrila, quando necessário, substituída por metanol ou tetrahidrofurano. O uso desses três solventes apenas deve-se à pequena quantidade de solventes orgânicos miscíveis com água. O princípio da retenção em fase reversa é baseado no caráter

hidrofóbico dos analitos. A separação em fase reversa se deve principalmente a interações entre a parte não-polar do soluto e a fase estacionária, isto é, à repulsão dessa parte do soluto pela fase móvel aquosa. Em cromatografia em fase reversa, a retenção diminui para compostos mais hidrofílicos, assim quando um ácido ou uma base é ionizada, estes se tornam menos hidrofóbicos e, conseqüentemente, a retenção é reduzida. Assim, com o aumento de pH, a retenção para ácidos diminui e para bases aumenta. A separação de compostos ionizáveis (ácidos e bases fracas) pode ser conseguida pela supressão da ionização, com a substituição da água da fase móvel por solução tampão, em pH adequado considerando o pKa dos analitos.⁸⁶

1.5 Validação Analítica⁸⁷⁻⁹⁰

A validação de um método analítico deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e recuperações adequadas à análise. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), tem determinado os parâmetros a serem estudados, bem como os limites de tolerância para um processo de validação de uma metodologia analítica.

A linearidade do método representa a faixa ou intervalo de concentração, onde a resposta do instrumento deve ser linear a concentração do analito.

A curva de calibração deve ser construída utilizando-se a matriz proposta para o estudo, deve conter no mínimo (6) seis pontos contendo padrão do fármaco e padrão interno, do limite de quantificação até 120 % da concentração mais alta que se pretende analisar. O desvio padrão relativo (RSD) deve ser menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o limite de quantificação e menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração. No mínimo 4 de 6 concentrações da curva de calibração devem cumprir esses critérios. O coeficiente de correlação linear (r) deve ser igual ou superior a 0,98. Deve ser apresentada uma análise da amostra de branco (matriz isenta de fármaco e padrão interno que também tenha sido submetido ao processo de extração).

A precisão de um método analítico é definida como a concordância entre vários resultados obtidos, quanto mais próximos entre si estiverem, maior a precisão. A precisão pode, também, ser expressa como precisão intra-ensaios, quando medida em um mesmo dia e interensaios quando medida ao longo de vários dias. Esse parâmetro deve ser avaliado em três níveis de concentração (baixo, médio e alto), realizando-se no mínimo 5 (cinco) determinações em cada concentração. A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o LOQ, para o qual se admite valores até 20%.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$CV = \frac{S}{x} \times 100$$

Onde:

S = desvio padrão

x_i = valor medido

\bar{x} = média dos valores obtidos

n = número de medidas

CV = coeficiente de variação ou desvio padrão relativo

A Exatidão é expressa através da razão entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente em três concentrações (baixa, média e alta) dentro da faixa de variação do procedimento, realizando-se pelo menos cinco réplicas de cada concentração, o desvio não deve exceder 15% (quinze por cento), exceto para o LOQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20% (vinte por cento).

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

O limite de detecção (LOD) de um método é a menor quantidade de analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada como um valor exato. Estabelecido por meio de análise de soluções de

concentrações conhecidas e decrescentes do fármaco, até menor nível detectável. Um procedimento comum tem sido estabelecer como limite de detecção a concentração do analito que gera um sinal 3 vezes maior que o sinal do ruído da linha de base.

O limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Pode se basear em diferentes critérios, mas, o mais comum é considerar o LOQ como sendo a concentração que produz um sinal com relação sinal/ruído igual a 10 e que o RSD para uma série de experimentos não seja superior a 20%.

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

A seletividade é a capacidade de um método em determinar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias susceptíveis de interferirem na determinação.

As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do fármaco e do padrão interno devem ser inferiores, respectivamente a 20% e 5 % da resposta na concentração utilizada.

Em geral, uma forma simples de verificar a seletividade de um método cromatográfico é observar a presença de picos na região do tempo de retenção do analito de interesse injetando-se um branco obtido com a mesma matriz a ser analisada.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Padronização do método extração sortiva em barra de agitação e cromatografia líquida de alta eficiência (SBSE/HPLC) para análise dos antidepressivos tricíclicos: **amitriptilina e imipramina** e seus respectivos metabólitos ativos **nortriptilina e desipramina**, dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina: **citalopram, e sertralina**, em amostras de plasma, para fins de monitorização terapêutica.

2.1.1 Otimização das condições cromatográficas (HPLC)

2.1.2 Otimização das variáveis SBSE.

2.2 Validação analítica do método SBSE/HPLC padronizado. Avaliação dos seguintes parâmetros de validação analítica: linearidade, precisão interensaios, recuperação, limite de quantificação e especificidade.

2.3 Análise de amostras de pacientes em terapia com antidepressivos para fins de monitorização terapêutica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

- Vidraria de uso comum em laboratório: balão volumétrico, béquer, espátula, funil, pipeta, pipetador, proveta
- Tubos de ensaio de vidro pyrex com fundo cônico de 15 mL
- Agitador de tubos phoenix (modelo AP 56)
- Chapa de aquecimento e agitação Corning
- Ultra-som Thornton
- pHmetro Orion (modelo 420 A)
- Sistema de purificação de água Milli-Q Plus (Millipore)
- Membrana para filtração de nylon, tamanho do poro: 0,45 μm , diâmetro: 47 mm (Varian)
- Barras sortivas de extração de 10 mm de comprimento recoberta com filme de PDMS de 0,5 mm de espessura, adquiridas do fornecedor Gerstel GmbH (Müllheim Ruhr, Germany).
- Frascos de vidro âmbar de 10 mL com tampa para SBSE

3.2 Solventes e Reagentes

A água utilizada foi destilada e purificada pelo sistema milli-Q da Millipore com condutividade de 18,2 $\text{M}\Omega \text{ cm}$. Os solventes utilizados como constituintes da fase móvel foram previamente filtrados em membrana 0,45 μm . O cloreto de sódio foi lavado com o solvente de dessorção (acetronitrila grau HPLC) para eliminar possíveis interferentes seguido por secagem a 300°C por 15 horas.

A procedência dos reagentes utilizados está descrita abaixo:

- Acetonitrila, grau HPLC, J.T.Baker,
- Ácido Acético, Merck, Rio de Janeiro- RJ (Brasil)
- Metanol grau HPLC, J.T.Baker, Phillipsburg (USA)
- Acetato de Sódio.3H₂O, Merck, Darmstadt, Germany
- Cloreto de Sódio, Merck, Rio de Janeiro- RJ (Brasil)
- Hidróxido de Sódio, Merck, Rio de Janeiro- RJ (Brasil)
- Tetraborato de Sódio, Sigma, St. Louis – MO (USA)
- Fosfato de Sódio, Sigma, St. Louis – MO (USA)

3.3 Preparo das soluções padrão dos antidepressivos

A procedência dos padrões dos antidepressivos está descrita abaixo, sendo que todos os fármacos apresentaram pureza superior a 99,9%.

- Cloridrato de Amitriptilina, Sigma, St. Louis – MO (USA)
- Cloridrato de Nortriptilina, Sandoz, São Paulo – SP (Brasil)
- Cloridrato de Imipramina, Ciba Geigy, São Paulo – SP (Brasil)
- Cloridrato de Desipramina, Ciba Geigy, São Paulo – SP (Brasil)
- Cloridrato de Clomipramina, Ciba Geigy, St. Louis – MO (USA)
- Cloridrato de Citalopram, Roche, São Paulo (Brasil)
- Cloridrato de Sertralina, Roche, São Paulo (Brasil)

Para o preparo das soluções estoque foram pesados 10 mg do padrão de cada fármaco, as quais dissolveram-se em 10 mL de metanol, obtendo-se a concentração de 1mg mL⁻¹. Todas as soluções foram armazenadas a

temperatura de -20°C em frasco âmbar, mantendo-se estáveis por até 6 meses. A partir das soluções estoque, por meio de diluições (também em metanol) prepararam-se as soluções de trabalho dos antidepressivos e do padrão interno nas concentrações desejadas.

3.4 Amostras de plasma

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

Para a otimização das variáveis SBSE e validação analítica do método padronizado, amostras de plasma branco de referência foram enriquecidas com 100 μL de padrão interno (clomipramina, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 100 μL de solução padrão contendo os antidepressivos, nas concentrações de 0,2 a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, que resultaram em concentrações plasmáticas as quais contemplam o intervalo terapêutico, de 20 a 1000 ng mL^{-1} .

As amostras de pacientes que fazem uso de antidepressivos foram coletadas pela manhã, com os pacientes em jejum, antes do horário da próxima medicação.(anexo)

3.5 Análises cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência equipado com detector ultra-violeta/visível, Varian 9050 e bomba ternária: Varian 9012, nas condições apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Condições cromatográficas empregadas na análise dos antidepressivos em amostras de plasma

Coluna	LICHROSPHER® 60 RP SELECT B – MERCK RP-18 (25 cm x 4,6 mm x 5µm)
Fase Móvel	Tampão acetato de sódio 0,1 mol L ⁻¹ pH 5,2 / Acetonitrila (60:40 v/v)
Modo de Eluição	Isocrático
Vazão da Fase Móvel	1,3 mL min ⁻¹
Temperatura	Ambiente (25 °C)
Comprimento de onda	230 nm
Volume injetado	50 µL

3.6 Padronização do método SBSE/HPLC para análise simultânea de antidepressivos

3.6.1 Condicionamento das barras SBSE

As barras SBSE revestidas com polidimetilsiloxano, antes de serem utilizadas nas extrações, foram condicionadas por 24 horas em solução acetonitrila:metanol (80:20 v/v). Entre as extrações sucessivas, as barras foram lavadas em metanol por 30 min a 50°C, sob agitação.

3.6.2 Avaliação e otimização dos parâmetros de SBSE

As amostras de plasma (1,0 mL) enriquecidas com 100 µL de solução de padrão contendo antidepressivos (0,2 a 10 µg mL⁻¹) e 100 µL de solução de padrão interno (clomipramina, 10 µg mL⁻¹) foram adicionadas em um frasco de extração pyrex com tampa de rosca e diluídos com 4 mL de solução tampão. A barra de polidimetilsiloxano foi adicionada ao frasco. As extrações SBSE foram realizadas sob agitação constante, com controle de tempo e temperatura. O processo de dessorção foi realizado em acetonitrila. Após a evaporação do solvente, o extrato foi reconstituído com 100 µL de acetonitrila e em seguida 50 µL do mesmo foram injetados no HPLC.

As variáveis do processo de extração SBSE (tempo, temperatura, força iônica, pH da matriz) e de dessorção (tempo e modo de dessorção) foram avaliados e otimizados, considerando a quantidade de analito extraído.

Para a otimização das condições de SBSE, a matriz plasma foi substituída por água, com o objetivo de aumentar a vida útil da barra de agitação. Após a otimização das condições SBSE, a matriz plasma foi utilizada na validação analítica do método padronizado.

3.6.2.1 Otimização do tempo e temperatura de extração

As amostras de água enriquecidas com os antidepressivos em estudo foram analisadas em diferentes temperaturas de extração (30, 50, 60 e 70°C) e, em cada temperatura, foram avaliados 4 diferentes tempos

de extração (15, 30, 45, 60 min). A dessorção foi realizada em acetonitrila a 60°C por 15 minutos.

3.6.2.2 Otimização do pH da matriz

Para favorecer a extração, o valor de pH da matriz deve ser ao menos duas unidades menor que o pKa dos analitos, para espécies com caráter ácido, e duas unidades maior que o pKa, no caso de espécies com caráter básico, tais como os antidepressivos. Este procedimento garante que a maior parte das moléculas dos analitos, presentes no meio, esteja em sua forma neutra (não protonada). A diluição da amostra aquosa com diferentes soluções tampão, foi avaliada nas seguintes condições: tampão fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹ pH 7,0; tampão borato de sódio 0,05 mol L⁻¹ pH 8,0; 9,0 e 10,0).

3.6.2.3 Avaliação do efeito da força iônica

Para a avaliação do efeito da força iônica na matriz aquosa foram comparados os resultados de extrações de amostras de água enriquecidas com antidepressivos sem adição de NaCl, com adição de 5%, 10% e 15% de NaCl.

3.6.2.4. Escolha do modo de dessorção

Foram avaliados dois métodos de dessorção: agitação magnética e ultra-som. Quando utilizado o ultra-som, a barra SBSE foi colocada no frasco contendo o solvente de dessorção, assegurando sua total imersão.

O frasco foi então, colocado no ultra-som por um período de 30 min à temperatura ambiente (25°C). Quando utilizado a agitação magnética a barra foi colocada num frasco que permitisse a agitação do solvente de dessorção e mantida a 50°C por 30 min.

3.6.2.5 Otimização do tempo de dessorção

As amostras de plasma enriquecidas com antidepressivos foram analisadas mantendo-se as condições de extração (50°C por 45 min) e foram avaliados diferentes tempos de dessorção a 50°C (10, 15, 20, 30, 60 min), para controle do *carryover*. Após a dessorção, a barra de agitação foi removida do frasco, seca em papel absorvente limpo e colocada em um frasco contendo acetonitrila durante 30 min. A cada 15 minutos o solvente era trocado.

3.7. Validação analítica do método SBSE/HPLC padronizado

3.7.1. Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através de amostras de plasma de referência, enriquecidas com antidepressivos em estudo. A faixa de concentração plasmática estudada para os seis antidepressivos foi de 20 a 1000 ng mL⁻¹.

3.7.2. Recuperação

A recuperação dos antidepressivos foi avaliada em três diferentes níveis de concentração. A recuperação relativa foi calculada da seguinte forma:

$$R = [(A_{am} / A_{ISm}) / (A_{ar} / A_{ISr})] \times 100 \quad \text{Equação}$$

Onde:

A_{am} = área do analito na amostra enriquecida

A_{ISm} = área do padrão interno na amostra enriquecida

A_{ar} = área do analito no padrão referência

A_{ISr} = área do padrão interno no padrão referência

3.7.3. Precisão

A precisão interensaio foi avaliada através do coeficiente de variação (%) das concentrações do analito obtidas, calculadas para cinco extrações em dias consecutivos em três concentrações distintas.

3.7.4. Limite de Quantificação

Os limites de quantificação foram determinados por meio de extrações de amostras de plasma fortificadas com soluções em concentrações decrescentes de antidepressivos. Foram selecionados picos cujas alturas foram dez vezes maiores que a altura do ruído da linha de base e cujos coeficientes de variação foram menores que 20%.

3.7.5. Especificidade

A especificidade foi determinada através da análise de várias alíquotas diferentes de plasma branco de referência de diferentes indivíduos e observada a ausência de picos na região do tempo de retenção dos analitos de interesse.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Condições cromatográficas HPLC

Várias condições cromatográficas foram testadas para obter satisfatória resolução cromatográfica em um menor intervalo de tempo de análise. A fase móvel acetonitrila: solução tampão acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 5,2; 40:60 v/v apresentou os melhores resultados. Apesar da grande semelhança estrutural dos analitos, observa-se completa separação entre os seis antidepressivos, bem como a separação destes com o padrão interno (clomipramina), empregado para a análise quantitativa. A ordem de eluição dos antidepressivos relaciona-se às interações destes com a coluna analítica em fase reversa (C₁₈) utilizada, sendo que os compostos eluídos em intervalos de tempo menores são os mais polares (hidrofílicos). Esta simples observação apresenta implicitamente o fato de que os processos de biotransformação sempre geram produtos mais hidrofílicos (polares), facilitando assim sua eliminação por meio da urina.⁹¹ Assim pode-se observar que a separação obtida apresenta os produtos de biotransformação (desipramina e nortriptilina) eluídos com menor tempo e isto está exatamente de acordo com o previsto.

A ordem de eluição dos compostos foi determinada por meio de injeções individuais dos padrões, ilustrada com os respectivos tempos de retenção na Tabela 10, enquanto a resolução cromatográfica dos fármacos é ilustrada na Figura 14.

Estabelecida a composição da fase móvel, tornou-se necessário otimizar a resposta do detector ultra-violeta de forma que o mesmo pudesse apresentar sensibilidade analítica adequada para análise dos antidepressivos em níveis terapêuticos preconizados na literatura. Assim, após ensaios realizados, o comprimento de onda $\lambda = 230$ nm foi selecionado, quando para isso 1 mL de plasma foi usado durante o processo de extração.

Tabela 10 - Ordem de eluição dos antidepressivos e seus respectivos tempos de retenção

<i>ANTIDEPRESSIVOS</i>	<i>TEMPOS DE RETENÇÃO (min)</i>
CITALOPRAM	10,66
DESIPRAMINA	13,07
NORTRIPTILINA	15,28
IMIPRAMINA	17,26
AMITRIPTILINA	20,19
SERTRALINA	22,42
CLOMIPRAMINA	26,42

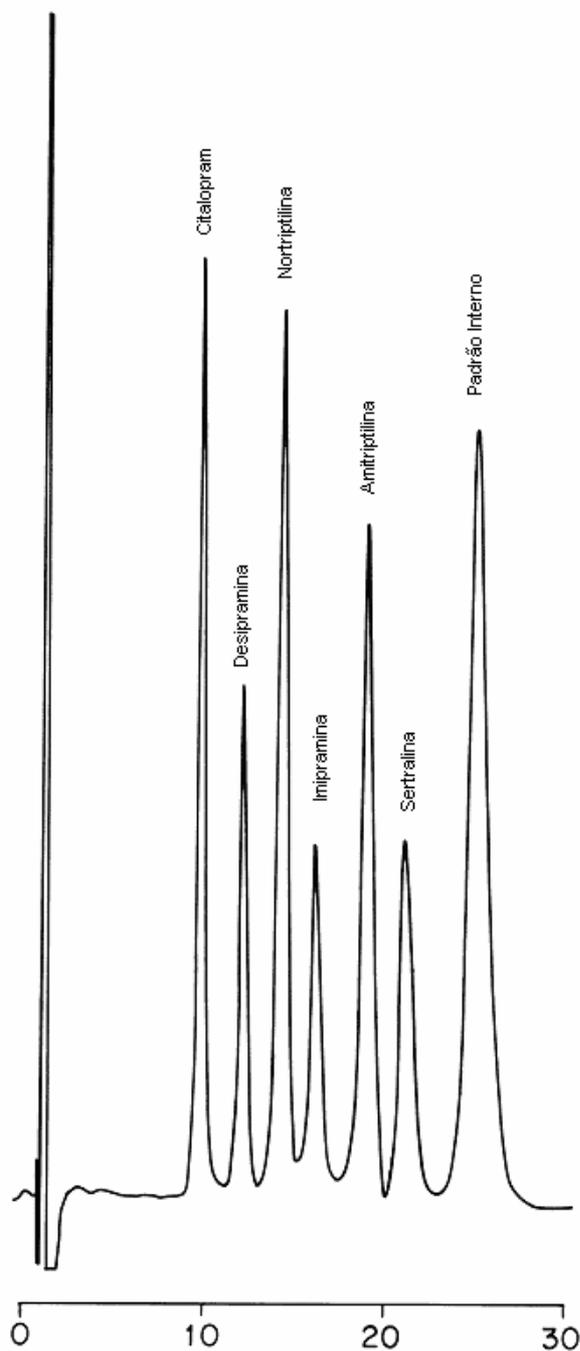


Figura 14 - Cromatograma referente à análise da solução padrão dos antidepressivos (500 ng mL^{-1}): 1: citalopram, 2: desipramina, 3: nortriptilina, 4: imipramina, 5: amitriptilina, 6: sertralina, 7: clomipramina. Coluna: Lichrospher[®] 60 RP Select B (Merck) (25mm x 4,6 mm x 5 μm). Fase móvel: Tampão acetato sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH= 5,2) / Acetonitrila (60:40 v/v); vazão da fase móvel: $1,3 \text{ ml min}^{-1}$. Volume injetado: $50 \mu\text{L}$. Detecção: 230 nm. Atenuação 8

4.2 Padronização do método SBSE/HPLC para análise simultânea de antidepressivos

O PDMS, revestimento polimérico homogêneo, extrai analitos via partição, no qual o analito solubiliza-se no revestimento e difunde-se no mesmo durante o processo de extração. Este processo é não-competitivo (em comparação com a adsorção) e a quantidade de analito extraído da amostra é independente da composição da matriz. Essa interação do analito com a fase extratora é mais fraca que na adsorção, a qual ocorre na superfície ativa e a degradação de analitos instáveis é menos significativa quando comparada à adsorção. Além disso, a capacidade de retenção do analito no revestimento PDMS não é influenciada pela presença de outros analitos ou a presença de interferentes, pois, cada analito tem seu equilíbrio de partição na fase PDMS. Não ocorre o deslocamento ou substituição de analitos de menor afinidade pelos de maior afinidade com a fase extratora.⁵⁴

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

O volume da amostra, velocidade de agitação e espessura do revestimento do polímero influenciam o tempo de equilíbrio de extração⁹²,

durante a otimização do procedimento de extração essas variáveis foram mantidas constantes.

4.2.1. Tempo e temperatura de extração

O aumento da temperatura aumenta a solubilidade, diminui a viscosidade favorecendo o processo de difusão dos analitos da matriz aquosa para a fase polimérica (PDMS) resultando em menor tempo de extração, no entanto, diminui a constante de distribuição do fármaco entre o revestimento PDMS e fase aquosa.⁹³

Nos experimentos realizados, as variáveis: tempo e temperatura de extração foram otimizadas em conjunto, para avaliar de forma mais adequada a influência destas variáveis no processo por SBSE.

Observou-se que o aumento da temperatura de 30°C para 50°C elevou o rendimento das extrações para todos os fármacos. Já os resultados obtidos nas temperaturas de 50°C e 60°C foram próximos para a maioria dos fármacos. O adicional aumento na temperatura para 70°C resultou em extrações menos eficientes, para a maioria dos analitos. Para a temperatura de 30°C, o equilíbrio de sorção não foi atingido no intervalo de tempo avaliado para a maioria dos analitos.

A melhor condição, entre as avaliadas, para a maioria dos antidepressivos foi a 50°C por 45 min. A eficiência das extrações de cada antidepressivo em relação ao tempo e temperatura de extração é apresentada nas Figuras 15 a 21.

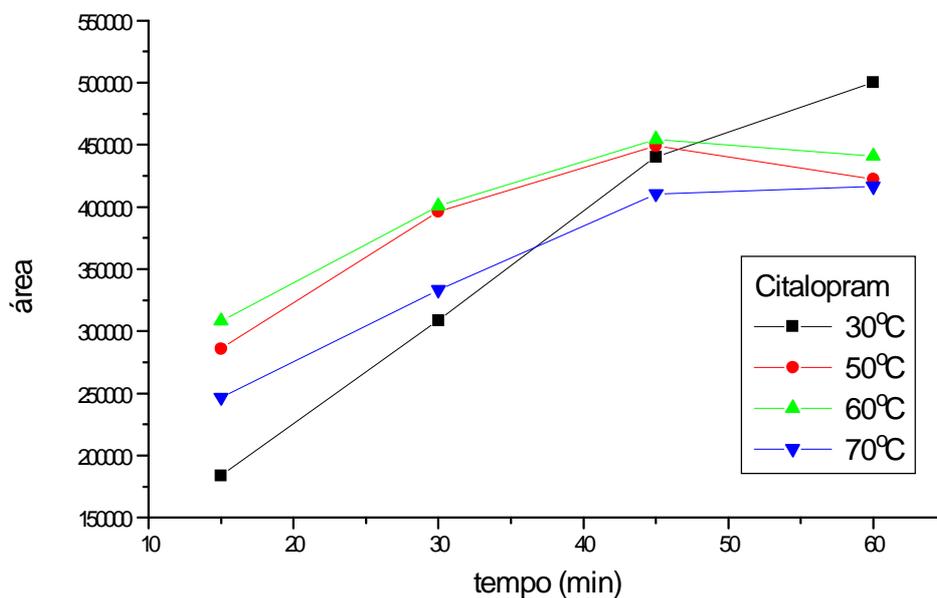


Figura 15 - Eficiência do processo SBSE em diferentes temperaturas e tempos de extração, para as análises de citalopram

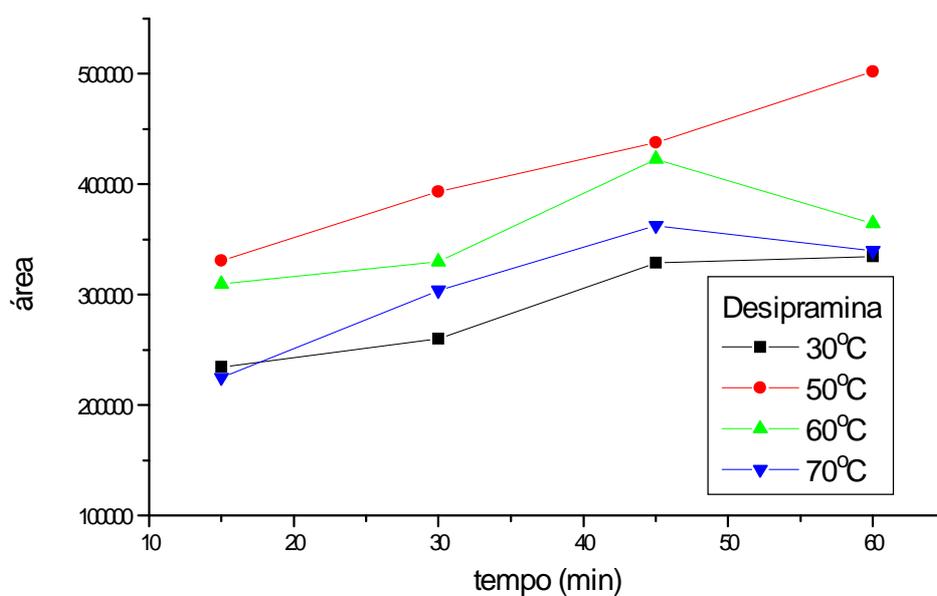


Figura 16 - Eficiência do processo SBSE em diferentes temperaturas e tempos de extração, para as análises de desipramina

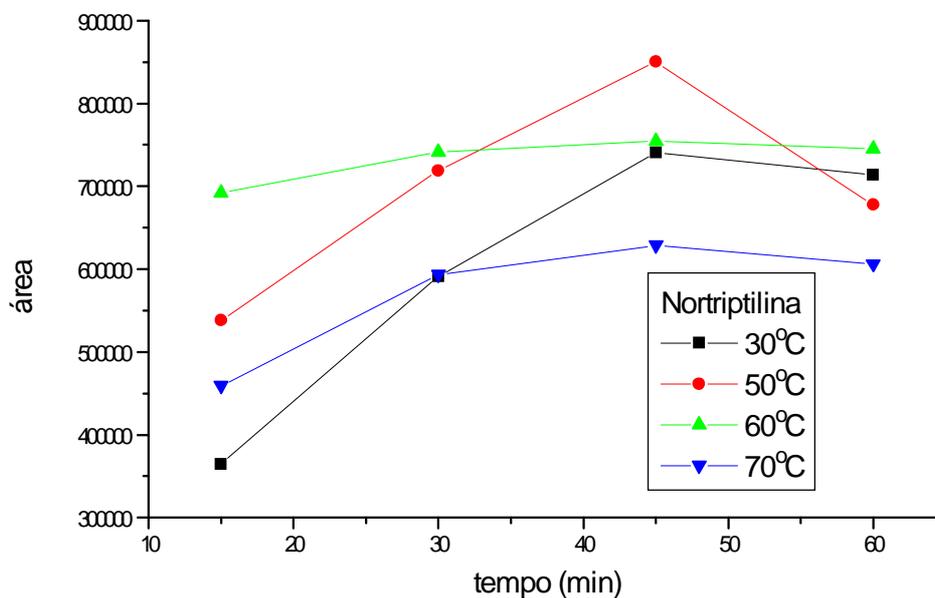


Figura 17 - Eficiência do processo SBSE em diferentes temperaturas e tempos de extração, para as análises de nortriptilina

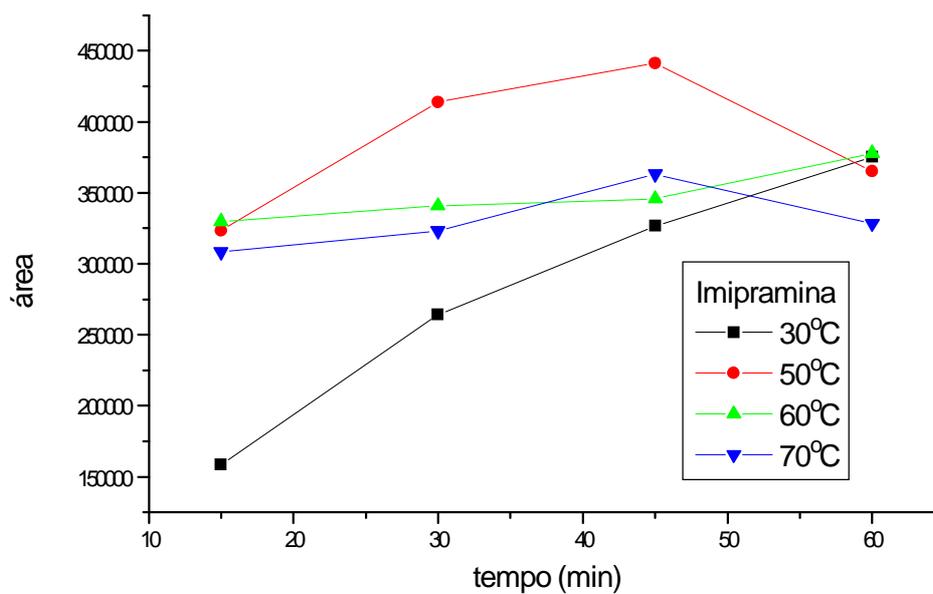


Figura 18 - Eficiência do processo SBSE em diferentes temperaturas e tempos de extração, para as análises de imipramina

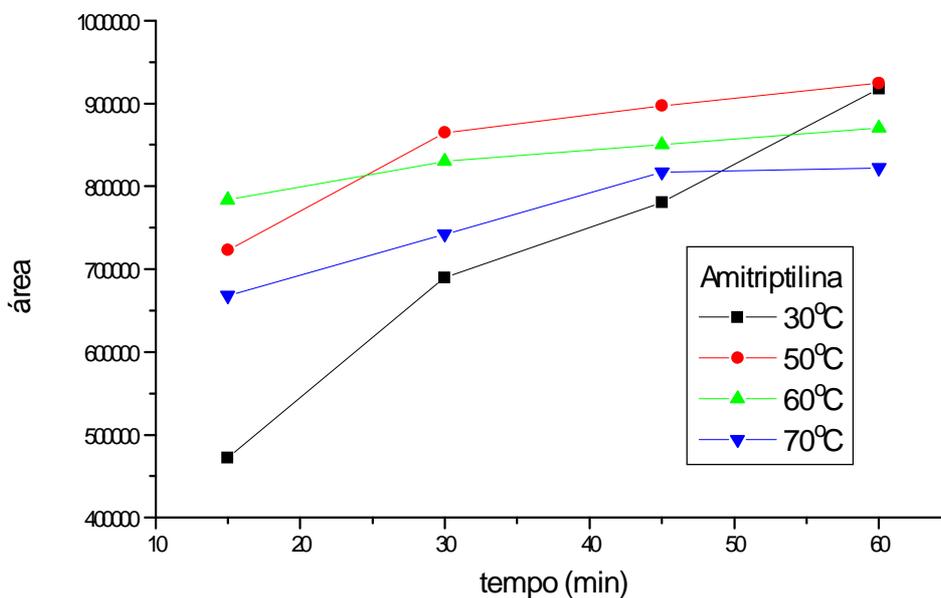


Figura 19 - Eficiência do processo SBSE em diferentes temperaturas e tempos de extração, para as análises de amitriptilina

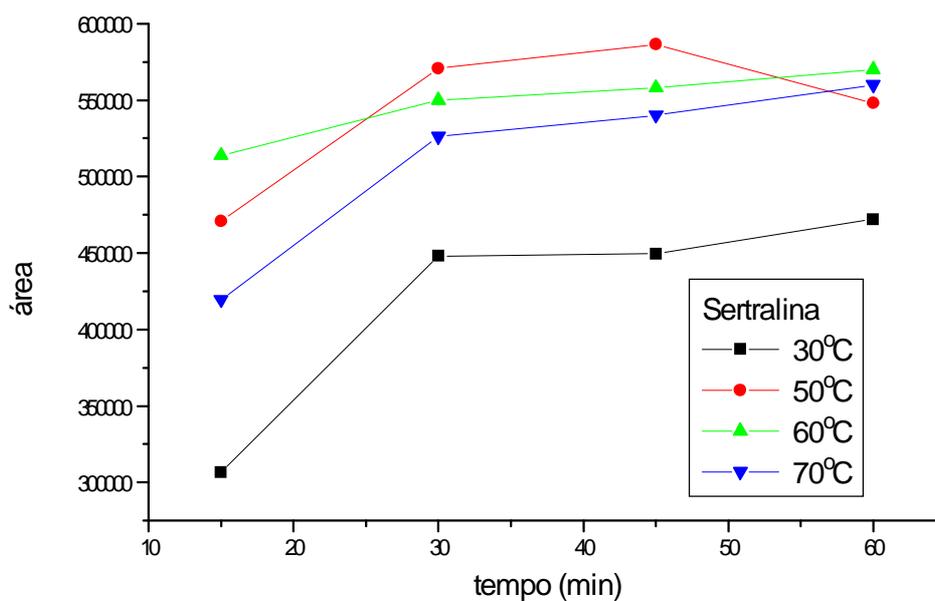


Figura 20 - Eficiência do processo SBSE em diferentes temperaturas e tempos de extração, para as análises de sertralina

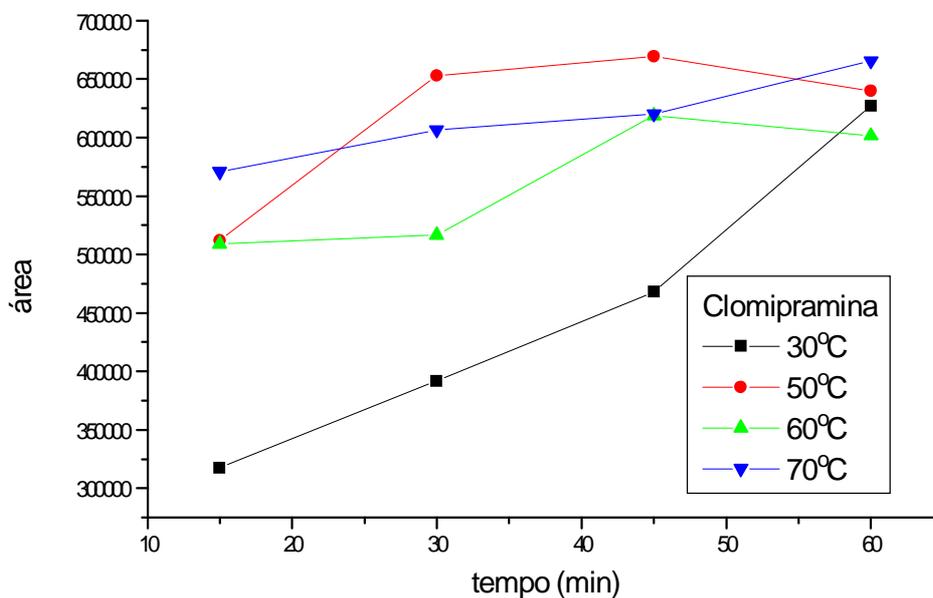


Figura 21 - Eficiência do processo SBSE em diferentes temperaturas e tempos de extração, para as análises de clomipramina

4.2.2 Estudo da Força iônica

O efeito da adição de sal (força iônica) na matriz aquosa foi também avaliado. A adição de sal exibe dois efeitos opostos sobre os analitos 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 analitos.⁹² Dessa forma, a atividade ou a concentração efetiva do analito em solução, aumenta a eficiência do processo SBSE. Para analitos na forma não dissociada, o efeito "salting out" é esperado. Em contra partida, com o aumento da força iônica, os íons do sal adicionado podem interagir com os analitos iônicos em solução através de interações eletrostáticas,

covalentes ou par iônico⁹², diminuindo a difusão do analito para a fase extratora. Observou-se que, com a adição de 5 e 10% de NaCl, a eficiência da extração diminuiu para todos os fármacos, voltando a aumentar quando foi adicionado 15% de NaCl, quase se aproximando da situação inicial, sem adição do sal.

Almeida e Nogueira⁸¹ relataram que porcentagens de NaCl maiores de 15% causaram saturação da solução e adsorção do sal junto ao revestimento PDMS, diminuindo a eficiência do processo de extração. Porcentagens de NaCl acima de 20% devem ser evitadas pois podem danificar seriamente a fibra de PDMS.⁸¹

O efeito da adição de NaCl no processo SBSE é ilustrado na Figura 22.

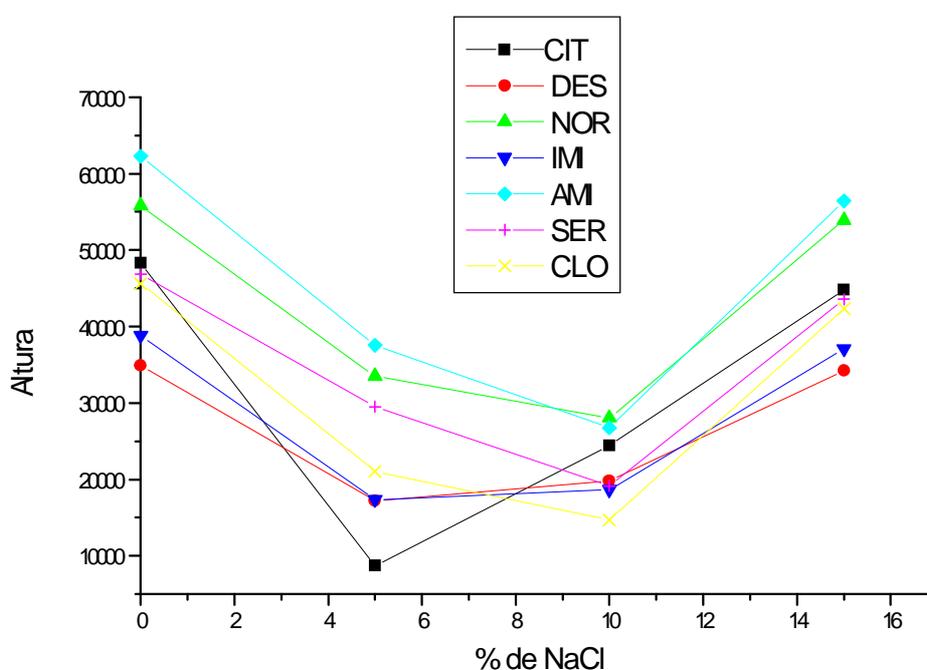


Figura 22 - Efeito da força iônica na eficiência do processo SBSE

4.2.3 Estudo do pH

Quando se trabalha com fármacos que apresentam grupos ionizáveis, o pH da matriz aquosa é um parâmetro relevante na otimização do processo SBSE. O revestimento de polidimetilsiloxano (PDMS) apresenta grande afinidade por analitos não iônicos⁹². O ajuste do pH da matriz biológica, para intervalos nos quais, os fármacos encontrem-se, na sua maior parte, na forma não dissociada, assegura extrações SBSE mais eficientes.

O efeito do pH da matriz aquosa na eficiência do processo SBSE pode ser observado na Figura 23. Foram selecionados os valores de pH 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0 de acordo com a faixa de pka dos fármacos analisados demonstrados na Tabela 11.

Tabela 11 – Pka dos antidepressivos analisados

<i>ANTIDEPRESSIVOS</i>	<i>PKa</i>
Citalopram	9,5
Desipramina	10,2
Nortriptilina	9,73
Imipramina	9,5
Amitriptilina	9,4
Sertralina	9,48

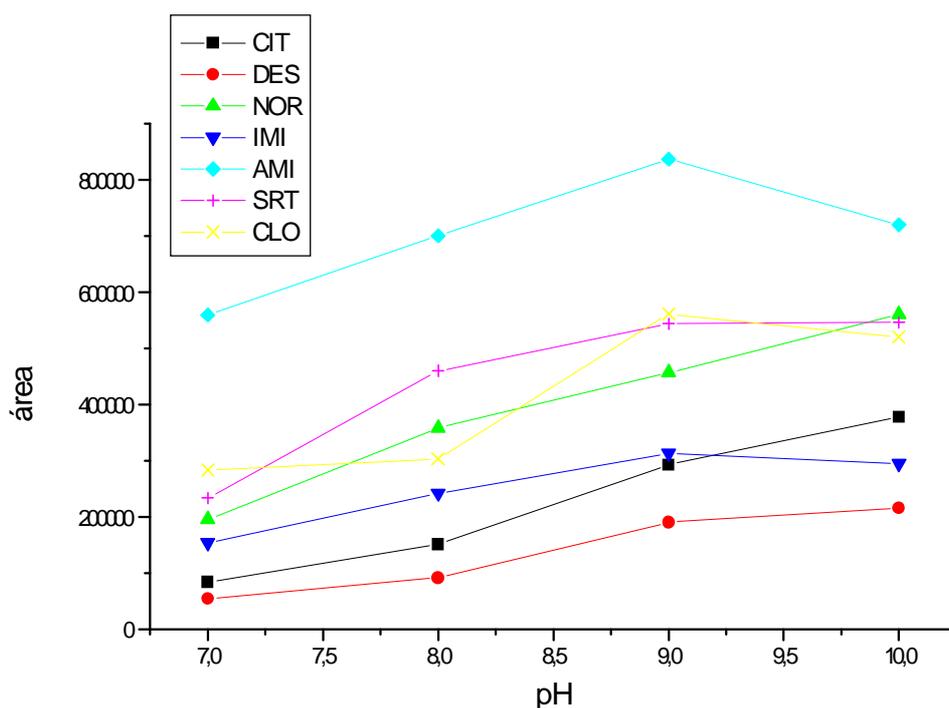


Figura 23 - Efeito da variação do pH da matriz no processo SBSE

Segundo a Figura 23 a maioria dos antidepressivos analisados apresentou resultados mais satisfatórios em solução tampão de borato de sódio, pH 9,0.

A sensibilidade do método SBSE/HPLC foi aprimorada com a diluição da amostra com solução tampão borato, pH 9,0, no qual a maioria dos fármacos encontram-se parcialmente ou totalmente na forma não iônica, o que possibilitou a extração com a fase PDMS. A diluição diminui a viscosidade da matriz, favorecendo, dessa forma, o processo de difusão dos analitos para a fase PDMS. Em matriz tamponada, o processo SBSE é mais eficiente, pois, as razões entre as formas ionizadas e não ionizadas dos fármacos são constantes.

A diluição do plasma com solução tampão também diminuiu a interferência das proteínas no processo SBSE. Compostos com alta massa molecular, como as proteínas, podem ser adsorvidas irreversivelmente no revestimento polimérico, mudando assim suas propriedades e diminuindo o tempo de vida útil da barra extratora. Um processo de limpeza das barras entre as extrações foi realizado para assegurar a remoção dos interferentes.

4.2.4 Modo de dessorção

Os modos de dessorção com agitação magnética e ultra-som foram avaliados, sendo que a agitação magnética apresentou os resultados mais satisfatórios, dobrando a eficiência do processo SBSE, conforme ilustra a Figura 24.

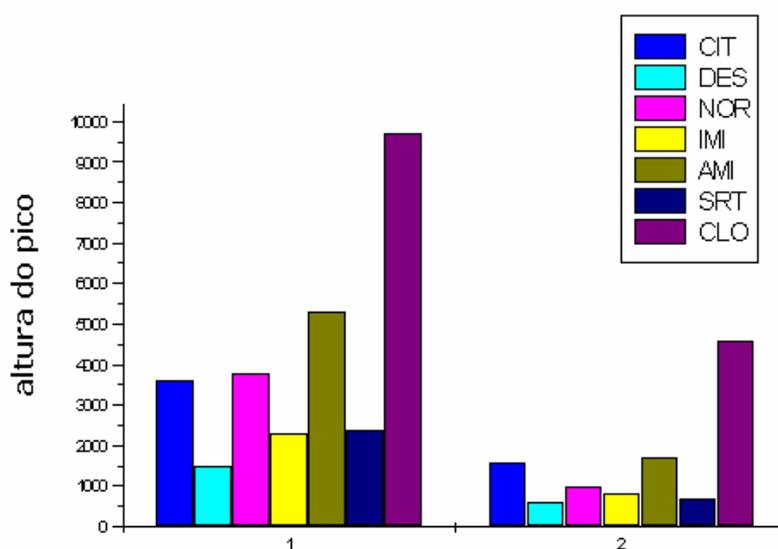


Figura 24 - Comparação da eficiência do processo SBSE segundo os modos de extração: 1-agitação com aquecimento e 2- ultra-som

4.2.5 Tempo de dessorção

O tempo de dessorção do processo SBSE foi também otimizado. Os princípios teóricos que regem o processo de dessorção dos analitos da 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 analitos no cromatograma, após o processo de dessorção, eliminando dessa forma, o efeito de memória e favorecendo a repetitividade dos resultados. O efeito do tempo de dessorção no processo SBSE é ilustrado na Figura 25.

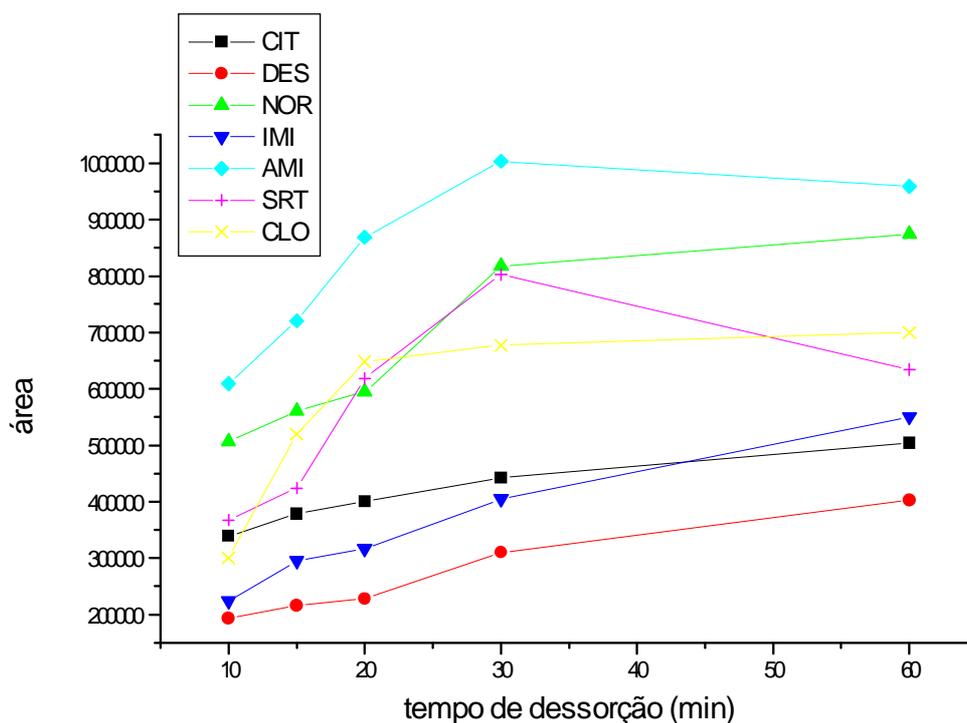


Figura 25 - Perfil da quantidade extraída de cada antidepressivo em função do tempo de dessorção

A maior parte dos fármacos apresentou eficiente processo de dessorção SBSE após 30 minutos, em acetonitrila a 50°C, temperatura padronizada para o processo de extração. Já para os fármacos: imipramina e desipramina, o equilíbrio de dessorção não foi atingido no intervalo de tempo avaliado. No entanto, nessas condições de dessorção, o processo SBSE apresentou sensibilidade analítica satisfatória. Dessa forma, o tempo de dessorção de 30 minutos foi selecionado para as análises posteriores. Uma etapa de limpeza da barra PDMS em metanol a 50°C por 30 minutos foi incluída no procedimento entre as extrações. A cada 15 minutos o solvente era trocado. Após esse procedimento, novo processo de dessorção foi realizado e não foram observados picos interferentes nos tempos de retenção dos fármacos.

A velocidade de agitação da barra de extração influenciou significativamente na eficiência do processo SBSE. O aumento da velocidade de agitação diminuiu o tempo necessário para atingir o equilíbrio de partição dos analitos. Assim, nos experimentos foi utilizada a máxima agitação permitida pela geometria do frasco de amostra.

Segundo os resultados obtidos (Figuras 15 a 23), as melhores condições SBSE, entre as avaliadas, foram as seguintes: 1 mL de plasma diluído com 4 mL de solução tampão borato (pH 9,0) em frasco âmbar com tampa rosca. A barra PDMS foi adicionada ao frasco e sob agitação constante a extração era realizada à temperatura de 50°C durante 45 min. O processo de dessorção foi realizado em acetonitrila a 50°C durante 30 minutos.

Segundo Sandra e colaboradores (2001),⁹³ 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, neste trabalho as variáveis SBSE foram otimizadas, para se obter adequada sensibilidade analítica, para análises de antidepressivos no intervalo terapêutico, cujas concentrações plasmáticas situam-se no intervalo de 25 a 550 ng mL⁻¹.

O fármaco, clomipramina, apresentou comportamento semelhante aos demais analitos durante a otimização do processo SBSE, desta forma o mesmo foi selecionado como padrão interno para as análises quantitativas.

4.3 Validação do método SBSE-HPLC padronizado

4.3.1 Linearidade

O parâmetro linearidade denota a capacidade do método em fornecer resultados quantitativos diretamente proporcionais à quantidade de analito presente na amostra. A linearidade do método SBSE-HPLC foi avaliada com amostras de plasma branco enriquecidas com os padrões dos antidepressivos em seis diferentes concentrações (20, 50, 100, 300, 500, 1000 ng mL⁻¹), de acordo com o procedimento descrito no item 3.4. Os coeficientes de regressão linear (r) obtidos pelo método dos mínimos quadrados foram maiores que 0,9941. Tais valores estão de acordo com o proposto para a validação de metodologias analíticas, segundo a

ANVISA⁸⁶, que estabelece valor mínimo de 0,98. A Tabela 12 apresenta a regressão linear e o coeficiente de correlação do método SBSE/HPLC, para os diferentes antidepressivos.

A menor concentração avaliada no estudo de linearidade, corresponde ao limite de quantificação, a qual apresentou variação menor que 20%. Dessa forma o limite de quantificação obtido para o método SBSE/HPLC foi de 20 ng mL⁻¹.

Tabela 12 - Parâmetros de linearidade obtidos na validação do método SBSE/HPLC

<i>Antidepressivos</i>	<i>Regressão Linear</i> <i>Coeficiente de Correlação (r)</i> <i>Intervalo avaliado (20 a 1000 ng mL⁻¹)</i>
CITALOPRAM	$y = 4169,4 + 6,2 x$ $r = 0,9969$
DESIPRAMINA	$y = 3674,9 + 4,3 x$ $r = 0,9943$
NORTRIPTILINA	$y = 2590,5 + 6,5 x$ $r = 0,9941$
IMIPRAMINA	$y = 2734,3 + 5,7 x$ $r = 0,9957$
AMITRIPTILINA	$y = 2328,9 + 10,26 x$ $r = 0,9952$
SERTRALINA	$y = 1373,4 + 3,6 x$ $r = 0,9972$

As Figuras de 26 a 31 ilustram as curvas de calibração, utilizadas nas análises quantitativas para os diferentes antidepressivos analisados.

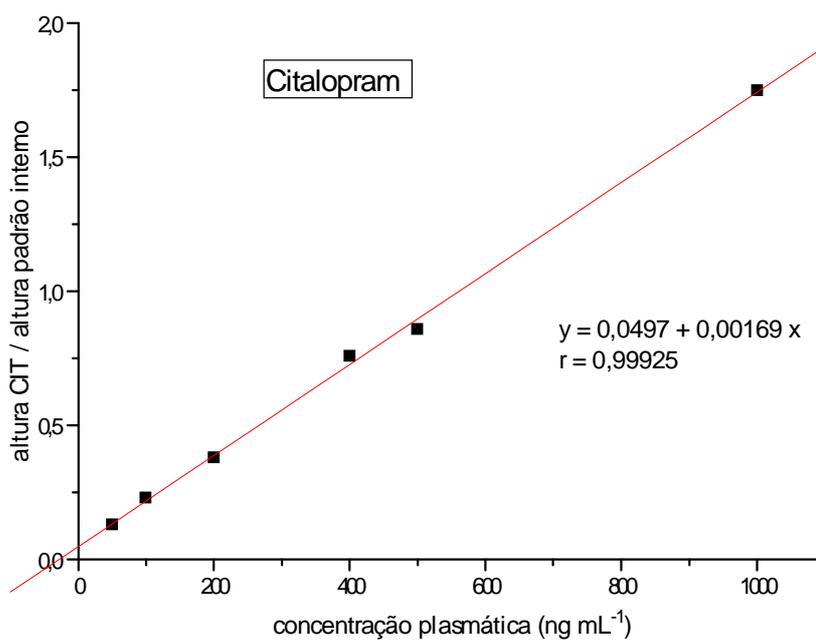


Figura 26 - Curva de calibração obtida para Citalopram. Intervalo de concentração plasmática avaliado: 50 a 1000 ng mL⁻¹

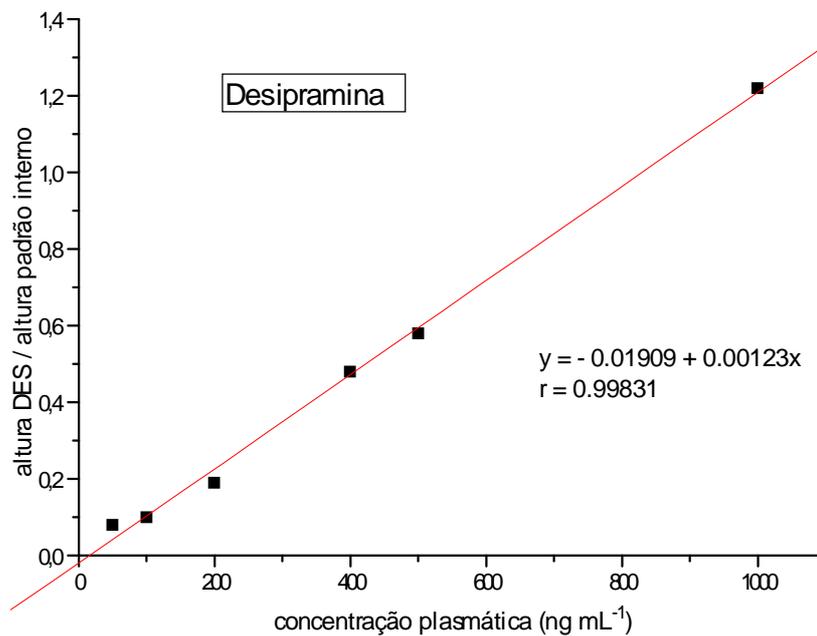


Figura 27 - Curva de calibração obtida para Desipramina. Intervalo de concentração plasmática avaliado: 50 a 1000 ng mL⁻¹

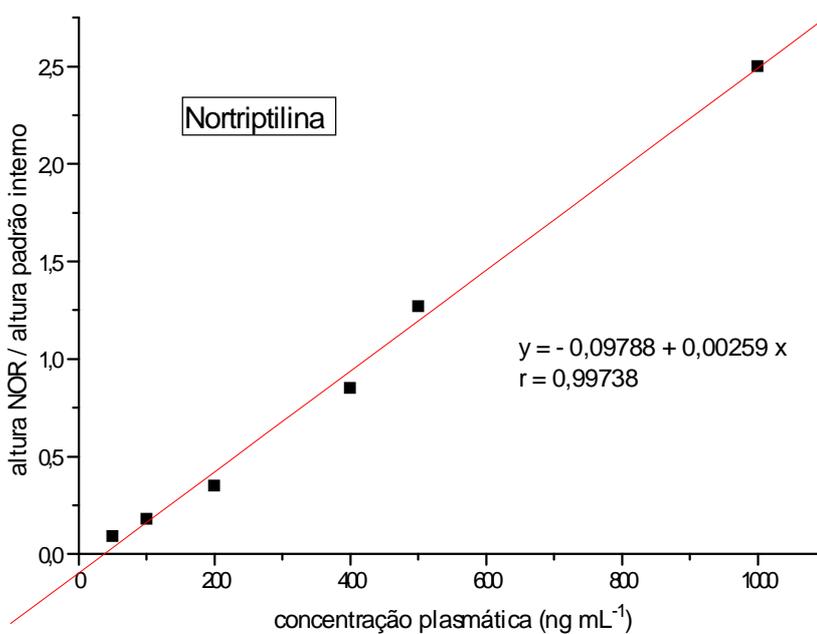


Figura 28 - Curva de calibração obtida para Nortriptilina. Intervalo de concentração plasmática avaliado: 50 a 1000 ng mL⁻¹

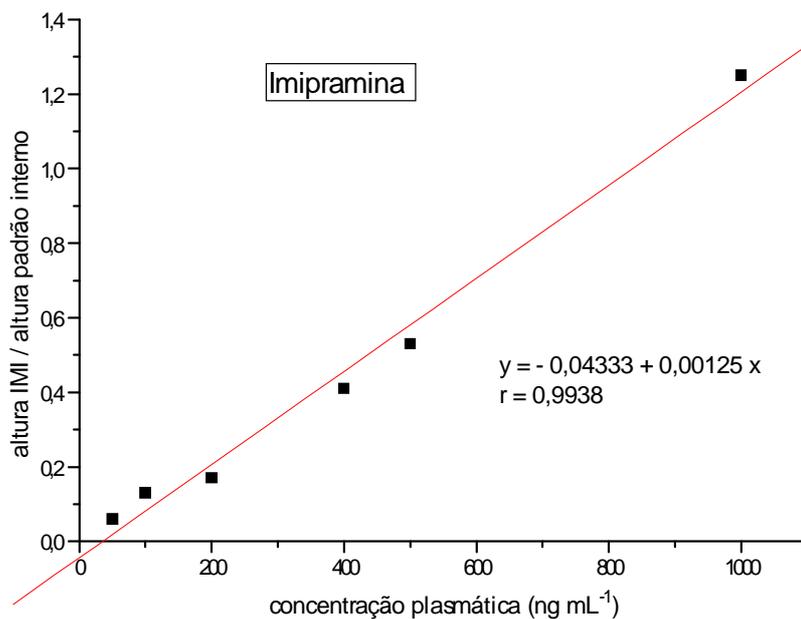


Figura 29 - Curva de calibração obtida para a. Imipramina. Intervalo de concentração plasmática avaliado: 50 a 1000 ng mL⁻¹

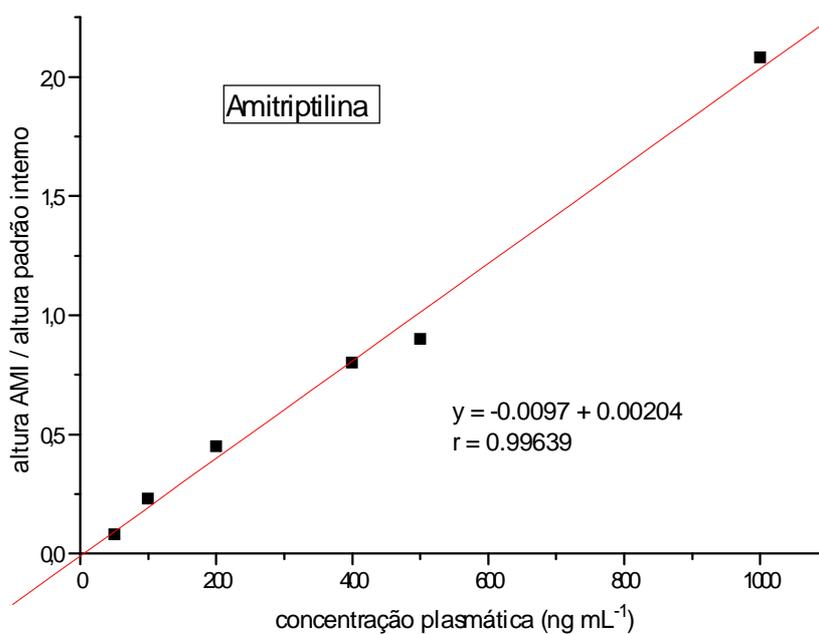


Figura 30 - Curva de calibração obtida para Amitriptilina. Intervalo de concentração plasmática avaliado: 50 a 1000 ng mL⁻¹

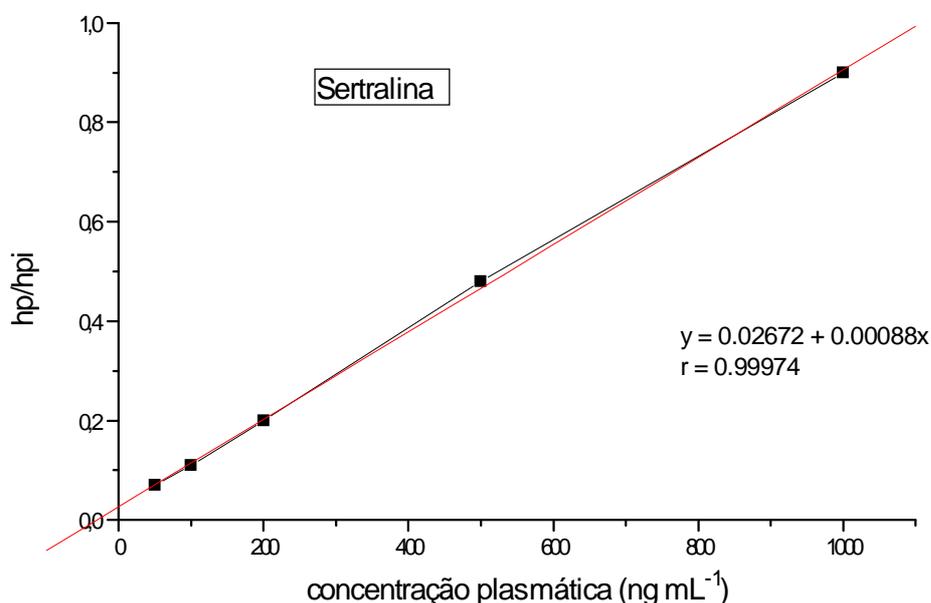


Figura 31 - Curva de calibração obtida para Sertralina. Intervalo de concentração plasmática avaliado: 50 a 1000 ng mL^{-1}

4.3.2 Recuperação relativa

A recuperação relativa representa a razão entre o quociente das áreas, do analito e do padrão interno extraídos de uma amostra enriquecida, e o quociente das áreas dos mesmos quando não submetidos ao processo de extração. A recuperação de um método de extração representa a eficiência do processo de extração, ou seja, expressa a porcentagem extraída dos analitos inicialmente presente na amostra. Os valores médios das recuperações relativas obtidas para os analitos estão apresentadas na Tabela 13, para amostras de plasma enriquecidas com três diferentes concentrações, sendo que, para cada concentração, os testes foram realizados em triplicata.

Tabela 13 – Recuperação relativa dos antidepressivos em três níveis de concentração

ANTIDEPRESSIVOS	Recuperação Relativa(%) n=3		
	Concentração adicionada		
	50 ng mL⁻¹	200 ng mL⁻¹	400 ng mL⁻¹
CITALOPRAM	92	84	97
DESIPRAMINA	100	83	100
NORTRIPTILINA	108	98	107
IMIPRAMINA	100	105	110
AMITRIPTILINA	91	100	110
SERTRALINA	100	103	95

Os valores de recuperação relativa obtidos para os antidepressivos nas três concentrações avaliadas foram de 83 e 110%. Esses valores estão de acordo com as normas preconizadas pela ANVISA.

4.3.3 Precisão interensaios

A Tabela 14 apresenta os valores de coeficiente de variação (CV) interensaios, concordância entre os ensaios realizados em dias consecutivos, em diferentes concentrações plasmáticas obtidos pelo método SBSE/HPLC.

A precisão interensaios apresentou coeficiente de variação (CV), menores que 14 %. Estes resultados são satisfatórios, segundo as normas da ANVISA, as quais preconizam coeficientes de variação inferiores a 15%. Segundo a Tabela 14, pode-se concluir que o método de extração utilizado comporta-se de forma semelhante nas três concentrações

estudadas. Estes resultados indicam que o método SBSE/HPLC apresenta precisão adequada para as medidas dos antidepressivos nas concentrações plasmáticas estudadas.

Tabela 14 – Precisão interensaios do método SBSE/HPLC em três níveis de concentração

<i>Antidepressivos Concentração adicionada (ng mL⁻¹)</i>	<i>Média das concentrações ± DP (ng mL⁻¹)</i>	<i>Precisão interensaios n=5 Coeficiente de Variação (%)</i>
Citalopram		
50	45,12 ± 3,72	8,25
200	197,80 ± 11,67	5,90
400	435,18 ± 23,87	5,49
Desipramina		
50	59,08 ± 5,54	9,40
200	192,24 ± 9,04	4,70
400	376,96 ± 11,39	3,02
Nortriptilina		
50	51,62 ± 5,83	11,3
200	194,42 ± 14,18	7,29
400	428,82 ± 12,85	3,14
Imipramina		
50	51,0 ± 6,18	12,10
200	224,84 ± 23,97	10,66
400	460,04 ± 50,47	10,97

continuação da tabela 14...

... continuação da tabela 14

<i>Antidepressivos</i> <i>Concentração adicionada</i> <i>(ng mL⁻¹)</i>	<i>Média das</i> <i>concentrações ± DP</i> <i>(ng mL⁻¹)</i>	<i>Precisão interensaios n=5</i> <i>Coefficiente de Variação</i> <i>(%)</i>
Amitriptilina		
50	54,42 ± 4,82	8,90
200	209,98 ± 12,88	6,13
400	452,36 ± 42,68	9,43
Sertralina		
50	44,64 ± 6,24	14,0
200	202,06 ± 18,25	9,03
400	438,18 ± 39,43	9,00

DP: Desvio Padrão

4.3.4 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LOQ) do método SBSE/HPLC foi de 20 ng mL⁻¹ para os antidepressivos estudados. Esta concentração representa um sinal analítico 10 vezes superior ao sinal do ruído da linha de base e CV inferior a 20 %. Para estimar o CV, (Tabela 15), foram realizadas cinco extrações com amostras de plasma enriquecidas com os antidepressivos em concentração referente ao LOQ. Os coeficientes de variação obtidos foram inferiores a 13,8 %, em concordância com as normas da ANVISA.

Tabela 15 – Precisão interensaios realizada com amostras de plasma enriquecidas com os antidepressivos na concentração de 20 ng mL⁻¹

<i>Antidepressivos</i>	<i>Coefficiente de Variação (%)</i>
CITALOPRAM	10,7
DESIPRAMINA	9,7
NORTRIPTILINA	2,9
IMIPRAMINA	8,4
AMITRIPTILINA	5,2
SERTRALINA	13,8

4.3.5 Especificidade

A especificidade (seletividade) do método SBSE/HPLC padronizado pode ser demonstrado pelos cromatogramas das análises de amostra de plasma branco de referência, e amostra de plasma branco de referência enriquecida com antidepressivos, resultando em concentração plasmática de 500 ng mL⁻¹, (Figuras 32 e 33). Nesses cromatogramas não foram observados picos interferentes de compostos endógenos nos tempos de retenção dos analitos. Outras amostras de plasma branco de referência, de diferentes indivíduos, foram também avaliadas, nas quais não foi observada nenhuma interferência significativa nos tempos de retenção dos analitos, o que demonstra a capacidade do método para quantificar, sem equívoco, os fármacos na presença de interferentes.

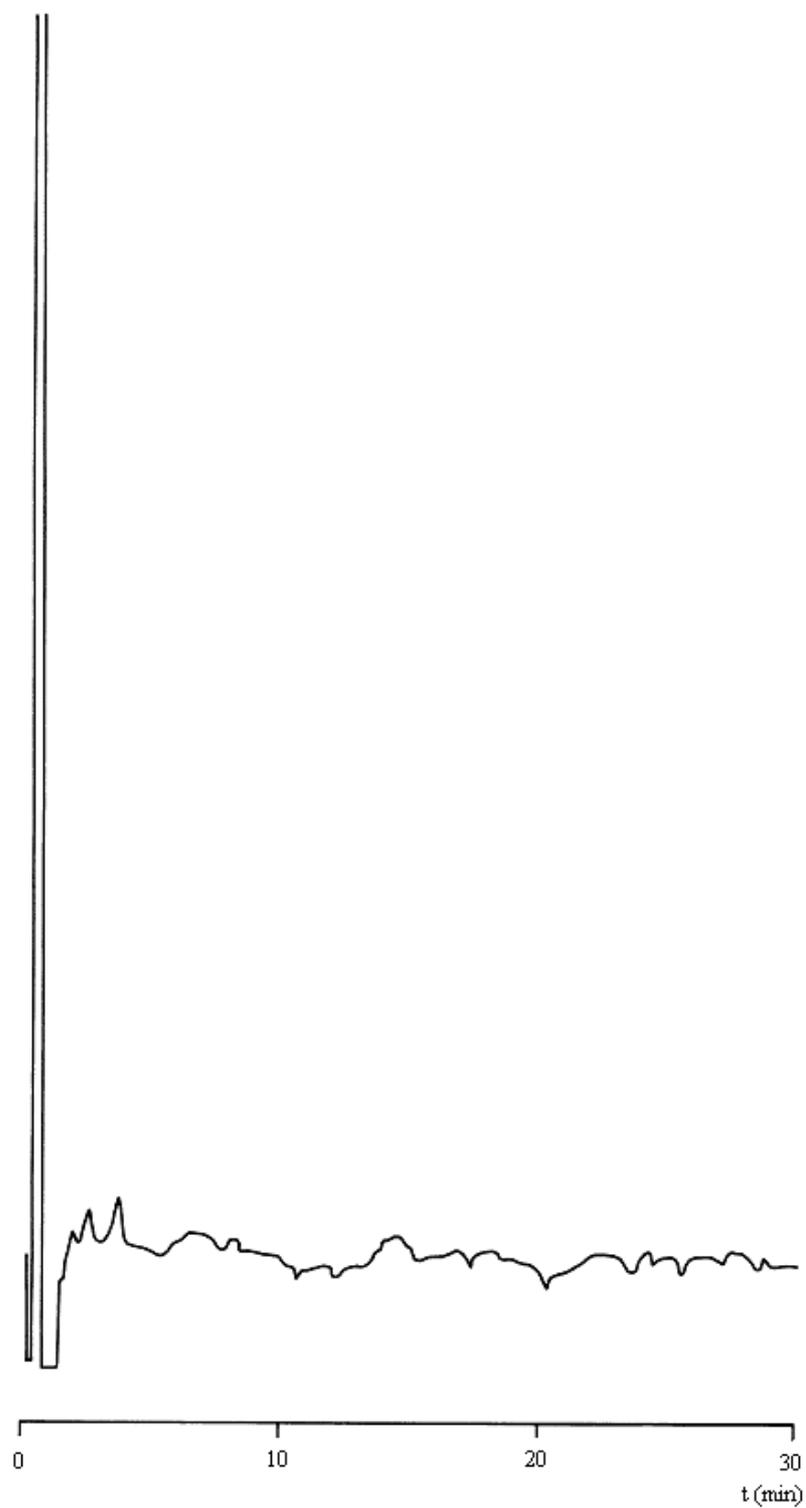


Figura 32 - Cromatograma SBSE/HPLC obtido de plasma branco de referência. As condições de análise estão descritas na Figura 14

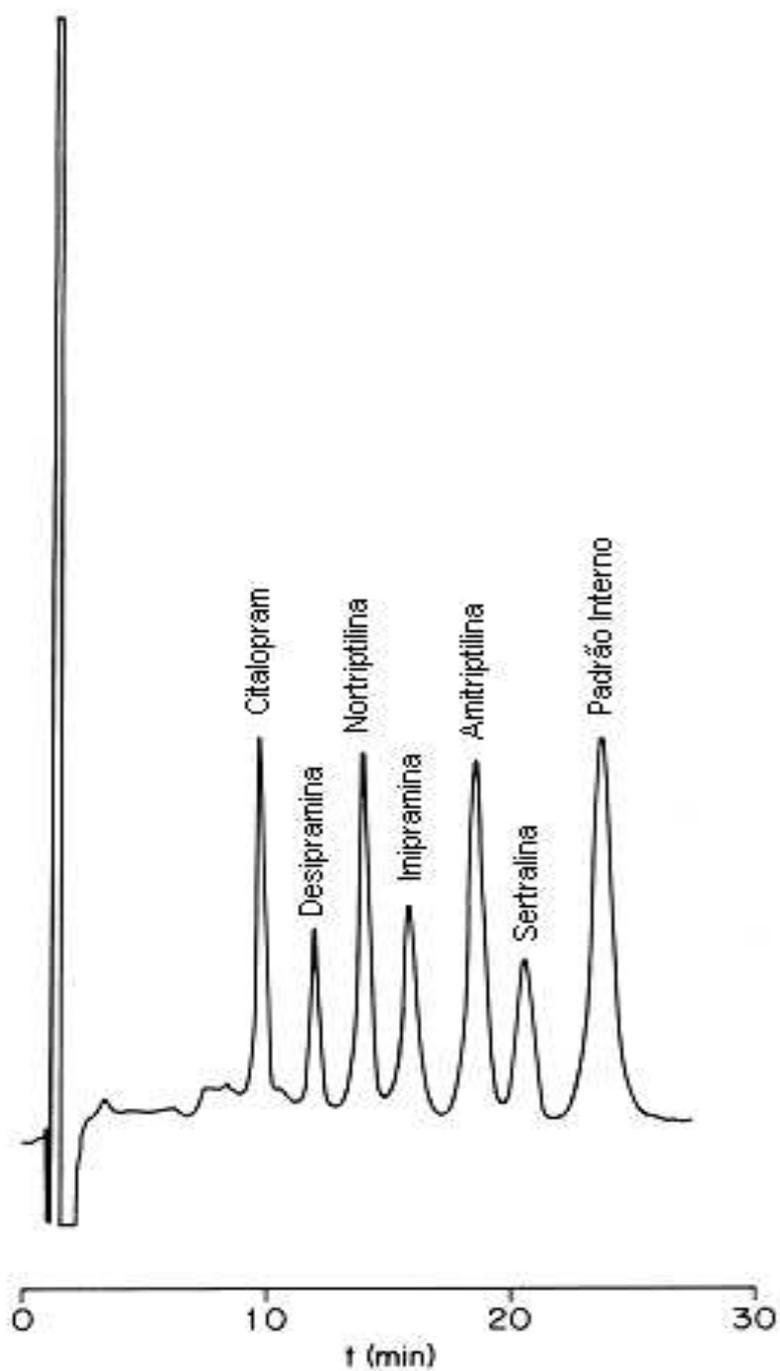


Figura 33 - Cromatograma SBSE/HPLC referente à amostra de plasma de referência enriquecida com antidepressivos (500 ng mL^{-1}). As condições de análise estão descritas na Figura 14

Baseado nos resultados de validação analítica, a metodologia SBSE/HPLC padronizada apresentou linearidade, precisão, especificidade e sensibilidade analítica adequadas para a análise simultânea dos antidepressivos: citalopram, desipramina, nortriptilina, imipramina, amitriptilina e sertralina em amostras de plasma em níveis terapêuticos a tóxicos.

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

Para avaliar a aplicabilidade do método SBSE/HPLC padronizado e validado, foram analisadas amostras de plasma de pacientes em terapia com os antidepressivos.

Os cromatogramas SBSE/HPLC referentes às análises destas amostras são apresentados nas Figuras 34 a 35. Segundo os resultados obtidos, podemos demonstrar que o método SBSE/HPLC padronizado, permite analisar amostras de plasma de pacientes, em concentrações plasmáticas que contemplam o intervalo terapêutico, para fins de monetarização terapêutica.

A Tabela 16 apresenta os dados das amostras dos pacientes analisados: dose diária, patologia e concentração plasmática determinada.

Tabela 16 - Concentração plasmática determinada para amostras de plasma de pacientes em terapia com antidepressivos

<i>Paciente</i>	<i>Fármaco</i>	<i>Dose diária (mg/dia)</i>	<i>Patologia</i>	<i>Concentração Plasmática (ng mL⁻¹)</i>
1	Citalopram	20	Depressão	50,0
2	Citalopram	10	Depressão	42,0
3	Amitriptilina	25	Depressão	245,0
4	Citalopram	20	Depressão	65,5
5	Amitriptilina	25	Fibromialgia	218,5
6	Sertralina	150	Depressão	225,2
7	Imipramina	75	Depressão	454,0

O perfil e resolução dos picos dos fármacos são similares àqueles obtidos com amostras de plasma branco enriquecidas com os fármacos.

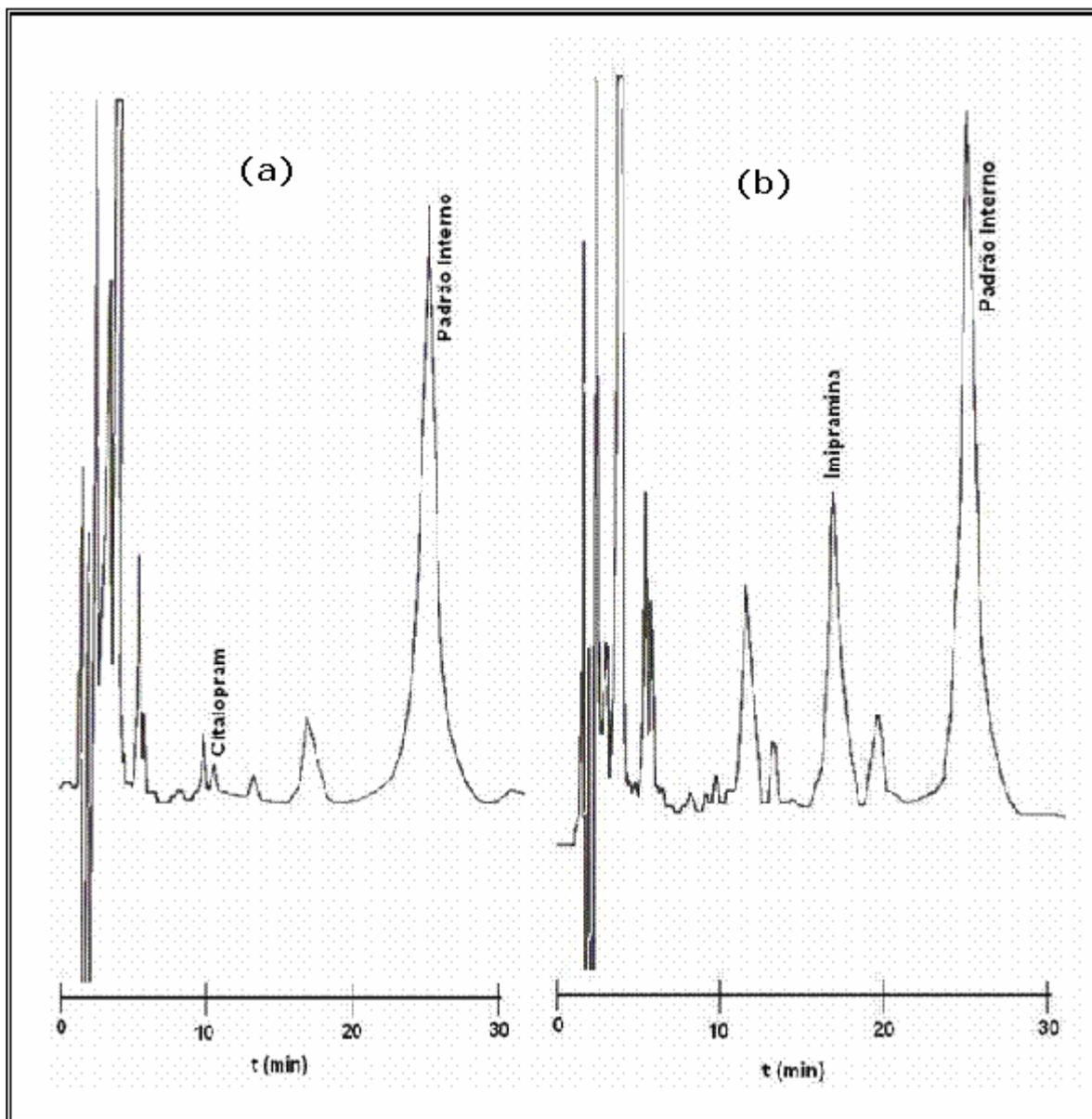


Figura 34 – Cromatograma referente à análise de amostras de plasma de pacientes em terapia com antidepressivos. Concentrações determinadas: (a) 50 ng mL⁻¹ de citalopram (b) 454 ng mL⁻¹ de imipramina

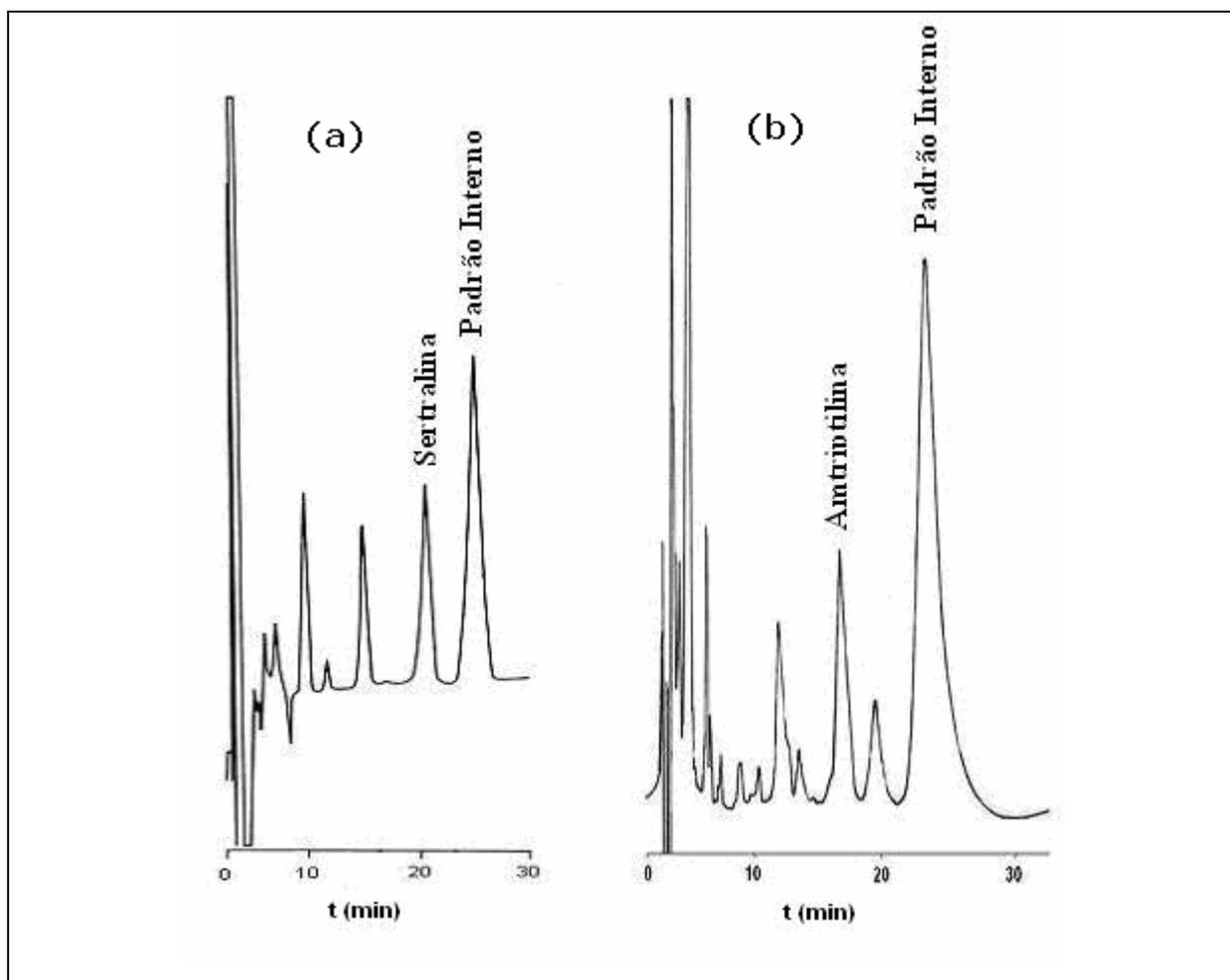


Figura 35 – Cromatograma referente à análise de amostras de plasma de pacientes em terapia com antidepressivos. Concentrações determinadas: (a) $225,2 \text{ ng mL}^{-1}$ de setralina, (b) $218,5 \text{ ng mL}^{-1}$ de amitriptilina

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A otimização das variáveis SBSE: pH da matriz, força iônica, tempo e temperatura de extração e processo de dessorção permitiu a avaliação da influência destas na extração e obtenção de eficiente processo SBSE.

O método SBSE/HPLC padronizado apresentou linearidade na faixa de concentração plasmática de 20 a 1000 ng mL⁻¹, para todos os antidepressivos estudados, a menor concentração desta faixa linear, corresponde ao limite de quantificação, no qual os coeficientes de variação foram menores que 20%.

A precisão interensaio apresentou coeficientes de variação menores que 14%, em três diferentes níveis de concentração. Os valores de recuperação relativa também avaliados, em diferentes níveis plasmáticos, variaram de 83 a 110%. Desta forma, os valores dos parâmetros de validação analítica avaliados são condizentes com as normas preconizadas pela ANVISA.

Segundo os parâmetros de validação analítica avaliados, o método SBSE/HPLC padronizado apresentou linearidade, precisão, especificidade e sensibilidade analítica adequadas à proposta do projeto, análise dos antidepressivos em níveis plasmáticos que incluem o intervalo terapêutico, permitindo a utilização desse método para fins de monitorização terapêutica.

A técnica SBSE apresentou as seguintes vantagens: simplicidade, utilização de volume reduzido de solvente orgânico, e reutilização de uma

única barra de sorção em mais de 50 extrações, com perda mínima da eficiência da extração.

A técnica SBSE, recentemente desenvolvida, ainda requer o estudo de novas fases extratoras, mais seletivas e específicas para as análises de fármacos em matrizes complexas, como os fluidos biológicos, as quais possibilitariam ampliar suas aplicações na área farmacêutica, assim como redução de custos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. FLECK, M.P.A; LAFER, B.; SOUGEY, E.B; DEL PORTO, J. A.; BRASIL, M. A.; JURUENA, M. F. Diretrizes da Associação Médica Brasileira para o tratamento da depressão. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 114-122, jun. 2003.
2. McQUAID, J. R.; STEIN, M. B.; LAFFAYE, C.; McCAHILL, M. E. Depression in a primary care clinic: the prevalence and impact of an unrecognized disorder. **J. Affect. Disord.**, Netherlands, v. 55, n. 1, p.1-10, sep. 1999.
3. DOCHERTY, J. P. Barriers to the diagnosis of depression in primary care. **J. Clin. Psychiatry**, United States, v. 58, n. 1, p. 5-10, 1997.
4. WEISSMAN, M. M.; BLAND, R. C.; CANINO, G. J. FARAVELLI, C.; GREENWALD, S.; HWU, H. G.; JOYCE, P. R.; KARAM, E. G.; LEE, C. K.; LELLOUCH, J.; LEPINE, J. P.; NEWMAN, S. C.; RUBIO-STIPEC, M.; WELLS, J. E.; WICKRAMARATNE, P. J.; WITTCHEN, H.; YEH, E. K. Cross-national epidemiologic of major depression and bipolar disorder. **JAMA**, Chicago, v. 276, n. 4, p. 293-9, jul. 1996.
5. MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D. Global mortality, disability and the contribution of risk factors: global burden of disease study. **Lancet**, London, v. 349, n. 9063, p. 1436-42, may. 1997.
6. WELLS, K. B.; STEWART, A.; HAYS, R. D., BURMAN, M. A.; ROGERS, W.; DANIELS, M.; BERRY, S.; GREENFIELD, S.; WARE, J. The functioning and well-being of depressed patients: results from the medical outcomes study. **JAMA**, Chicago, v. 262, n. 7, p. 914-9, aug. 1989.
7. ANDERSON, I. M.; NUTT, D. J.; DEAKIN, J. F.. Evidence-based guidelines for treating depressive disorders with antidepressants: a revision of the 1993 British Association for Psychopharmacology guidelines. British Association for Psychopharmacology. **J. Psychopharmacol.**, United States, v. 14, n. 1, p. 3-20, mar. 2000.
8. MONTGOMERY. A. S. Long-term treatment of depression. **Br. J. Psychiatry.**, England, v. 165, n. 26, p. 31-6, 1994.

9. KUPFER, D. J. Long-term treatment of depression. **J. Clin. Psychiatry.**, United States, v. 52, n. 5, p. 28-34, may. 1991.
10. ISRAILI, Z. H. Pharmacokinetics of psychiatric drugs in selected patient populations. In: MUSA, M. N. **Pharmacokinetics and therapeutic monitoring of psychiatric drugs**. Springfield: Charles C. Thomas, 1993. p. 41-56.
11. BEZCHLIBNYK-BUTLER, K. Z.; JEFFRIES, J. J. **Clinical handbook of psychotropic drugs**. 9. ed. Seattle: Hogrefe & Huber, 1999.
12. KAPLAN, H. I.; SADOCK, B. J.; GREAB, J. A. Compêndio de Psiquiatria. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 1997.
13. MORENO, R. A.; MORENO, D. H.; SOARES, M. B. M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 24-40, may.1999.
14. PRADO, F. C.; RAMOS, J. A.; VALLE, J. R. **Atualização terapêutica**: manual prático de diagnóstico e tratamento. 20 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2001. 1433 p.
15. VASWANI, M.; LINDA, F. K.; RAMESH, S. Role of selective reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review., *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.*, Oxford, v. 27, p.85-102, 2003.
16. GOODNICK, P. J.; GOLDSTEIN, B. J. Selective serotonin reuptake inhibitors in affective disorders – I: Basic pharmacology. **J. Psychopharmacol.**, Oxford, v. 12, n. 3, p. S3-S20, 1998.
17. YACUBIAN, J.; MINUTENTAG, N. Tratamento dos transtornos de pânico com inibidores seletivos da recaptura de serotonina. **Rev. Psiq. Clín.**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 19-22, 2001.
18. SUCAR, D.D. **Fundamentos de interações medicamentosas**. São Paulo: Lemos, 2003. 238 p.

19. CARRASCO, J.L.; SANDNER, C.; Clinical effects of pharmacological variations in selective serotonin reuptake inhibitors: an overview. **Int. J. Clin. Pract.**, Oxford, v.59, n.12, p.1428-34, dec. 2005
20. TAYLOR, W. J.; ROBINSON, J. D.; SPIVEY-MILLER, S. **Handbook of therapeutic monitoring**. 2. ed. Cincinatti: Harvey Whitney Books Company, 1993.
21. WORDEN, J. P. Therapeutic drug monitoring. **Curr. Surg.**, New York, v. 51, n. 7, p. 4299-435, 1994.
22. 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. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v.18, n. 4-5, p. 751-6, dec. 1998.
23. 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. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci**, Elsevier, v. 769, n.2, p. 333-9, apr. 2002.
24. 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. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, Elsevier, v. 794, n. 1, p. 35-47, aug. 2003.
25. MANDRIOLI, R.; SARACINO, M.A.; FERRARI, S.; BERARDI D.; KENNDLER E.; RAGGI M.A. HPLC analysis of the second-generation antidepressant sertraline and its main metabolite N-desmethylsertraline in human plasma. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci**, Elsevier, v. 836, n. 1-2, p. 116-9, may.2006.
26. 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). **J. Chromatogr. B.**, Netherlands, v. 820, n. 1, p.33-39, jun. 2005.

27. CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho**. São Paulo: Edgard Blücher, 1998. 179 p.
28. SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Analytical chemistry: an introduction**. Philadelphia: Saunders College, 1990. 642 p.
29. DAY, R. A.; UNDERWOOD, A. L. **Quantitative analysis**. New Jersey: Prentice-Hall, 1991. 685 p.
30. WALKER, V.; MILLS, A.G. Solid-phase extraction in clinical biochemistry. *Ann. Clin. Biochem.*, London, v.39, p. 464-477, 2002.
31. PAWLISZYN, J. **Applications of solid phase microextraction**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999.
32. PAWLISZYN, J. Theory of solid-phase microextraction. **J. Chromatogr. Sci.**, Evanston, v. 38, n. 7, p. 270-8, 2000.
33. PAWLISZYN, J. **Solid phase microextraction: theory and practice**. New York: Wiley, 1997. 247 p.
34. DAVID F.; TIENPONT, B.; SANDRA, P. Stir-bar sorptive extraction of trace organic compounds from aqueous matrices. **LCGC North América**, New York, v. 21, n. 2, p. 1-7, feb. 2003.
35. VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO F. Microextração por fase sólida. **Quim. Nova**, São Paulo, v.23, n.4, p.523-30, jul/aug. 2000.
36. LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos, 2004. 96 p.
37. CHEN, J.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. **Anal. Chem.**, Washington, v. 67, n. 15, p.2530-2533, aug. 1995.
38. SAITO, Y.; KAWAZOE, M.; HAYASHIDA, M.; JINNO, K. Direct Coupling of microcolumn liquid chromatography with in-tube solid-

- phase microextraction for the analysis of antidepressant drugs. **Analyst.**, England, v. 125, n.5, p.807-9, may. 2000.
39. QUEIROZ, M. E. C.; SILVA, S. M.; CARVALHO, D.; LANÇAS, F. M. Comparison between solid-phase extraction methods for the chromatographic determination of organophosphorus pesticides in water. **J. Environ. Sci. Health B**, New York, v. 36, n.5, p. 517-27, sep. 2001.
 40. SOUZA D. A.; LANÇAS, F. M. Solventless sample preparation for pesticides analysis in environmental water samples using solid-phase microextraction : high resolution Gas Chromatography/Mass Spectrometry (SPME-HRGC/MS). **J. Environ. Sci. Health B**, New York, v. 38, n. 4, p. 417-28, jul. 2003.
 41. RODRIGUES, R.; LACERDA, C. A.; LANÇAS, F. M. Coating of solid-phase microextraction fibers with chemically bonded silica particles: selective extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from drinking water samples. **J. Chromatogr. Sci.**, Evanston, v. 40, n.9, p. 489-94, oct. 2002.
 42. BARRIONUEVO, W. R; LANÇAS, F. M. Comparison of liquid-liquid extraction (LLE), solid-phase extraction (SPE), and solid-phase microextraction (SPME) for pyrethroid pesticides analysis from enriched river water. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 69, n. 1, p. 123-8, jul. 2002
 43. QUEIROZ, M. E. C.; SILVA, S. M.; CARVALHO, D.; LANÇAS, F. M. Determination of lamotrigine simultaneously with carbamazepine, carbamazepine epoxide, phenytoin, Phenobarbital, and primidone in human plasma by SPME-GC-TSD. **J. Chromatogr. Sci.**, Evanston, v. 40, n. 4, p. 219-23, apr. 2002.
 44. QUEIROZ, M E. C.; VALADÃO, C. A. A.; FARIAS, A.; CARVALHO, D.; LANÇAS, F. M. Determination of amitraz in canine plasma by solid-phase microextraction gas chromatography with thermionic specific detection. **J. Chromatogr. B**, Netherlands, v. 794, n. 2, p. 337-42, sep. 2003.
 45. ARTHUR, C.L.; PRATT, K.; MOTLAGH, S.; PAWLISZYN, J.; BELARDI, R. L. Environmental analysis of organic compounds in water using

- solid phase microextraction. **J. High Resolut. Chromatogr.**, Heidelberg, v. 15, n.11, p.741-4, nov. 1992.
46. YANG, Y.; HAWTHORNE, S. B.; MILLER, D. J.; LIU, Y.; LEE, M. L. Adsorption versus absorption of polychlorinated biphenyls onto solid-phase microextraction coatings. **Anal. Chem.**, Washington, v. 70, n. 9, p. 1866-9, mar. 1998.
47. BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; JANSSEN, H.-G.; CRAMERS, C. Study into the Equilibrium Mechanism Between Water and Poly (dimethylsiloxane) for very apolar solutes: adsorption or Sorption. **Anal. Chem.**, Washington, v. 71, n. 22, p. 5213-6, nov. 1999.
48. BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; CRAMERS, C. A.; Stir bar extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. **J. Microcol. Sep.**, v. 11, n. 10, p. 737-47, 1999.
49. BALTUSSEN, E.; CRAMERS, C. A.; SANDRA, P. J. Sortive sample preparation - a review. **Anal. Bioanal. Chem.**, Heidelberg, v. 373, n. 1-2, p. 3-22, may. 2002.
50. GARCÍA-FALCÓN, M. S.; CANHO-GRANDE, B.; SIMAL-GÁNDARA, J. Stirring bar sorptive extration in the determination of PAHs in drinking waters. **Water Res.**, England, v. 38, n. 7, p. 1679-84, apr. 2004.
51. TIENPONT, B.; DAVID, F.; DESMET, K.; SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary GC-MS applied to biological fluids. **Anal. Bioanal. Chem.**, Heidelberg, v. 373, n. 1-2, p. 46-55, may. 2002.
52. JUAN-GARCIA, A.; MANES, J.; FONT, G.PICO, Y. Evaluation of solid-phase extraction and stir-bar sortive extraction for the determination of fungicide residues at low- μgKg^{-1} levels in grapes by liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1050, n. 2, p. 119-27, oct. 2004.

53. TIENPONT, B.; DAVID, F.; BICCHI, C.; SANDRA, P. High capacity headspace sorptive extraction. **J. Microcol. Sep.**, Eugene, v. 12, n. 11, p. 577-84, 2000.
54. POPP, P.; BAUER, C.; WEINRICH, L. Application of stir bar sorptive extraction in combination with column liquid chromatography for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam., v. 436, n. 1, p. 1-9, jun. 2001.
55. TREDoux, A G. J.; LAUER, H. H.; HEIDEMAN, T.; SANDRA, P. Determination of benzoic acid in lemon flavored beverages by stir bar sorptive extraction CGC-MS. **J. High Resolut. Chromatogr.**, A. Huethig, v. 23, n. 11, p. 644-6, 2000.
56. NAKARUMA, S.; NAKARUMA, N.; ITO, S. Determination of 2-methylisoborneol and geosmin in water by gas chromatography-mass spectrometry using stir bar sorptive extraction. **J. Sep. Sci.**, Weinheim, v. 24, n.8, p. 674-7, aug. 2001.
57. KOLAHGAR, B.; HOFFMANN, A.; HEIDEN, A. C. Evaluation of the Method of Stir Bar Sorptive Extraction for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in water samples. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CAPILLARY CHROMATOGRAPHY, 25., 2002. **Proceedings**... Riva del Garda, Italy, 2002. 1 CD-ROM.
58. POPP, P.; KEILL, P.; MONTERO, L.; RÜCKERT, M. Optimized method for the determination of 25 polychlorinated biphenyls in water samples using stir bar sorptive extraction followed by thermodesorption-gas chromatography/mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1071, p. 155-162, 2005.
59. SERÔDIO, P.; NOGUEIRA, J.M.F. Development of stir-bar-sorptive extraction-liquid desorption-large-volume injection capillary gas chromatographic-mass spectrometric method for pyrethroid pesticides in water samples. **Anal. Bioanal. Chem.**, Lisboa, v. 382, p. 1141-1151, 2005.
60. OCHIAI, N.; SASAMOTO, K.; TAKINO, M.; YAMASHITA, S.; DAISHIMA, S.; HEIDEN, A. C.; HOFFMANN, A. Determination of trace amounts of off-flavor compounds in drinking water by stir bar

- sorptive extraction and thermal desorption GC-MS. **Analyst.**, England, v. 126, n.10, 1652-7, oct. 2001.
61. VERCAUTEREN, J.; PÉRÈZ, C.; DEVOS, C.; SANDRA, P.; VANHAECKE, F.; MOENS, L. Stir bar sorptive extraction for the determination of ppq-level traces of organotin compounds in environmental samples with thermal desorption-capillary gas chromatography-ICP mass spectrometry. **Anal. Chem.**, United States, v. 73, n. 7, p.1509-14, apr. 2001.
 62. 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. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1041, n. 1-2, p. 19-26, jul. 2004.
 63. DEMYTTENAERE, J.C.R.; DAGHER, C.; VERHÉ, R.; SANDRA, P. Flavour Analysis of Greek White Wine Using Solid Phase Microextraction-Capillary GC/MS. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CAPILLARY CHROMATOGRAPHY, 25., 2002. **Proceedings...** Riva del Garda, Italy, 2002. 1 CD-ROM.
 64. SANDRA, P; TIENPONT, B.; DAVID, F. Multi-residue screening of pesticides in vegetables, fruits and baby food by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, 1000(1-2):299-309, Jun 6, 2003
 65. SANDRA, P; TIENPONT, B.; VERCAMMEN, J.; TREDoux, A.; SANDRA, T.; DAVID, F. Stir bar sorptive extraction applied to the determination of dicarboximide fungicides in wine. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.928, n.1, p. 117-26, aug. 2001.
 66. DAVID, F.; TREDoux, A.; BALTUSSEN, E.; HOFFMANN, A.; SANDRA, P. Determination of contaminants in wine using Stir Bar Sorptive Extraction. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CAPILLARY CHROMATOGRAPHY, 23., 2000. **Proceedings...** Riva del Garda, Italy, 2000. 1 CD-ROM.

67. BICCHI, C.; CORDERO, C.; IORI, C.; RUBIOLO, P.; SANDRA, P. Stir Bar Sorptive Extraction in sample preparation from Heterogeneous Matrices: determination of pesticide residues in pear pulp at ppb Level. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CAPILLARY CHROMATOGRAPHY, 25., 2002. **Proceedings...** Riva del Garda, Italy, 2002. 1 CD-ROM.
68. WAHL, H. G.; PETERFI, C.; HOFFMANN, A.; LIEBICH, H. M. Analysis of drugs in human body fluids by Stir Bar Sorptive Extraction and Thermal Desorption GC/MS. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CAPILLARY CHROMATOGRAPHY, 23., 2000. **Proceedings...** Riva del Garda, Italy, 2000. 1 CD-ROM.
69. WAHL, H. G.; PETERFI, C.; HOFFMANN, A.; LIEBICH, H. M. Analysis of plasticizers and their metabolites in body fluids and infusates by Stir Bar Sorptive Extraction and thermal desorption GC/MS. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CAPILLARY CHROMATOGRAPHY, 23., 2000. **Proceedings...** Riva del Garda, Italy, 2000. 1 CD-ROM.
70. SOINI, H. A.; BRUCE, K. E.; WIESLER, D.; NOVOTNY, M. Quantification of volatiles in mammalian urine by Stir Bar Sorptive Extraction techniques and Gas Chromatography. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CAPILLARY CHROMATOGRAPHY, 25., 2002. **Proceedings...** Riva del Garda, Italy, 2002. 1 CD-ROM.
71. DESMET, K.; KISS, P.; DE HERTOOGH, M.; SANDRA, P. Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolites in Urine Using in-situ Derivatisation Stir Bar Sorptive Extraction-CGC/MS. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CAPILLARY CHROMATOGRAPHY, 25., 2002. **Proceedings...** Riva del Garda, Italy, 2002. 1 CD-ROM.
72. TIENPONT, B.; DAVID, F.; BENIJTS, T; SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary GC-MS for profiling and target component analysis of pharmaceutical drugs in urine. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, England, v. 32, n. 4-5, p. 569-79, aug. 2003.
73. BENIJTS, T.; VERCAMMEN, J.; DAMS, R.; TUAN, H. P.; LAMBERT, W.; SANDRA, P. Stir Bar sortive extration-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry applied to the analysis of polychlorinated biphenyls in human sperm. **J.**

- Chromatogr. B**, Netherlands, v. 755, n. 1-2, p. 137-42, may. 2001.
74. FERNANDES, C.; JIAYU, P.; SANDRA, P.; LANÇAS, F.M. Stir bar sorptive extraction-LC-MS for the analysis of fluoxetine in plasma. **Chromatographia** 2006, 64, 517-521.
75. LAMBERT, J. P.; MULLET, W. M.; KWONG, E.; LUBDA, D. Stir bar sorptive extraction based on restricted access material for the direct extraction of caffeine and metabolites in biological fluids. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.1075 n. 1-2, p. 43-9, may. 2005.
76. KAWAGUCHI, M.; INOUE, K.; SAKUI, N.; ITO, R.; IZUMI, S.; MAKINO, T.; OKANOUCI, N.; NAKAZAWA, H. Stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for the measurement of 4-nonyphenol and 4-tert-octylphenol in human biological samples. **J. Chromatogr. B**, Netherlands, v. 799, n. 1, p. 119-25, jan. 2004.
77. KAWAGUCHI, M.; INOUE, K.; YOSHIMURA, M.; ITO, R.; SAKUI, N.; IZUMI, S.; OKANOUCI, N.; NAKAZAWA, H. Determination of bisphenol A in river water and body fluid samples by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. B**, Netherlands, v. 805, n. 1, p. 41-8, jun. 2004.
78. STOPFORTH, A.; TREDoux, A.; CROUCH, A.; HELDEN, P.; SANDRA, P. A rapid method of diagnosing pulmonary tuberculosis using stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1071, n. 1-2, p. 135-9, apr. 2005.
79. KAWAGUCHI, M.; SAKUI, N.; OKANOUCI, N.; ITO, R.; SAITO, K.; IZUMI, S.; MAKINO, T.; NAKAZAWA, H. Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for measurement of phenolic xenoestrogens in human urine samples. **J. Chromatogr. B**, Netherlands, v. 820, n. 1, p. 49-57, jun. 2005.
80. KAWAGUCHI, M.; ISHII, Y.; SAKUI, N.; OKANOUCI, N.; ITO, R.; SAITO, K.; NAKAZAWA, H. Stir bar sorptive extraction with in situ

- derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for determination of chlorophenols in water and body fluid samples. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam,. v. 533, p. 57-65, 2005.
81. ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J.M.F. Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Lisboa .2006 in press
 82. STOPFORTH, A.; BURGER, B.V.; CROUCH, A.M.; SANDRA, P. Urinalysis of 4-hydroxynonenal, a marker of oxidative stress, using stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography/mass spectrometry. **J. Chromatogr. B**, Netherlands, v. 834, p. 134-140, 2006.
 83. CHAVES, A.R.; SILVA, S.M.; QUEIROZ, R.H.; LANÇAS, F.M.; QUEIROZ, M.E. Stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with UV detection for determination of depressants in plasma samples. **J. Chromatog. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, Amsterdam, 2006. In press
 84. LOUGH, W. J.; WAINER, I. W. **High performance liquid chromatography**: fundamental principles and practice. London: Chapman & Hall, 1996. 276 p.
 85. JHONSON, E. L.; STEVENSON, R. **Basic liquid chromatography**. Palo Alto: Varian Associates, 1978. 354 p.
 86. CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC**: fundamentos, estratégias e validação. São Carlos: Ed. UFSCAR, 2001. 77 p.
 87. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Resolução-RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Anexo Guia para validação de métodos analíticos**. Brasília, jun. 2003.

-
88. CAUSON, R. Validation of chromatography methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. **J. Chromatogr. B**, Netherlands, v. 689, n. 1, p. 175-80, feb. 1997.
 89. LANÇAS, F.M. Validação de métodos cromatográficos de análise. São Carlos: Rima, 2004. 62p.
 90. LEITE, F. Validação em análise química. 4.ed. Campinas: Átomo, 2002. p.65-75.
 91. KALANT, H.; ROSCHLAU, W. H. E. **Princípios de farmacologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989. 687 p.
 92. WALLIS, M.; MULLETT, W. M.; PAWLISZYN, J. Monitoring of drugs and metabolites in whole blood by restricted-access solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1025, n.1, p. 85-92, jan. 2004.
 93. SANDRA, P.; TIENPONT, B.; VERCAMMEN, J.; TREDoux, A.; SANDRA, T.; DAVID, F. Stir bar sorptive extraction applied to the determination of dicarboximide fungicides in wine. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 928, n. 1, p. 117-26, aug. 2001.

ANEXOS



ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO COLABORADOR DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE PARA
O DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA EM ENFERMAGEM

Avenida Bandeirantes, 3900 - Campus Universitário - Ribeirão Preto - CEP 14040-902 - São Paulo - Brasil
FAX: 55 - 016 - 633-3271 / 55 - 016 - 630-2561 / TELEFONES: 55 - 016 - 633-0379 / 602-3382

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA EERP/USP

Of.CEP-EERP/USP - 008/99

Ribeirão Preto, 1 de junho de 1999.

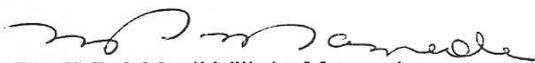
Prezada Senhora,

Comunicamos que o projeto de pesquisa, abaixo especificado, foi analisado e considerado **APROVADO** pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo:

Protocolo: nº 0013/1999
Projeto: **MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DE FÁRMACOS ANTIDEPRESSIVOS EM PACIENTES ASILADOS EM ABRIGOS FILANTRÓPICOS**
Pesquisadora : Prof^a Dr^a Regina Helena Costa Queiroz

Em atendimento à Resolução 196/96, deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou a sua interrupção.

Atenciosamente,


Profª Drª Marli Villela Mamede
Coordenadora do CEP-EERP/USP

Ilm^a Sr^a

Profª Drª Regina Helena Costa Queiroz

Professora Doutora do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP

PESQUISA CIENTÍFICA
DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

NOME DO PACIENTE:

IDADE:

RESPONSÁVEL LEGAL, SE FOR O CASO:

TIPO:

REGISTRO E/OU DOCUMENTO DE IDENTIFICAÇÃO:

PACIENTE:

RESPONSÁVEL:

TÍTULO DO PROJETO: Monitorização terapêutica de fármacos antidepressivos em pacientes asilados em abrigos filantrópicos.

RESPONSÁVEL CLÍNICO PELO PROJETO: *Dr^a. Maria Nazareth G. V. da Silva* Coodernadora do Programa de Saúde do Idoso do Serviço Municipal de Saúde

Coordenador do Projeto: Prof^a. Dr^a *Regina Helena Costa Queiroz* (FCFRP-USP)

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Os pacientes serão incluídos na investigação após a obtenção, por escrito, do Consentimento Pós-Informação. Os pacientes considerados vulneráveis ou incapazes serão assistidos por familiares ou pelo responsável direto dos respectivos abrigos filantrópicos.

Declaro que em/...../..... concordei voluntariamente em participar, como paciente do projeto de pesquisa acima referido. Fui devidamente informado em detalhes pelo médico responsável conforme o texto abaixo:

1-Senhor “Fulano de Tal”, o senhor toma esses remédios, que são os antidepressivos, para que o senhor fique mais tranqüilo, mais calmo e adormeça com maior facilidade. Esses mesmos medicamentos apesar de serem muito importante no tratamento do senhor, podem acabar “atacando”, comprometendo principalmente o fígado. Com o tempo o senhor vai ficando um pouco indispsto após as refeições, podendo ter dores

na altura do fígado. Então para evitar este problema é muito importante que o senhor tome a DOSE certa do medicamento. É através deste sangue, que nós estamos colhendo do senhor, é que vamos ver se a dose do medicamento realmente está certa, e também vamos ver com está o fígado do senhor.

É importante que o exame seja feito “em jejum” para que dê certo. No dia anterior da coleta o senhor tome todos os remédios normalmente e venha cedinho para o posto em jejum para colher o sangue, depois tome seu “café da manhã” e continue tomando todos os remédios normalmente. Com esses exames o senhor não correrá NENHUM tipo de risco, a medicação não sofrerá nenhuma mudança. A única coisa que o senhor terá que fazer é vir até o posto e colher o sangue, para saber se está tudo bem.

2-O estudo implica em que eu me submeta a procedimentos, exames complementares e tratamentos devidamente planejados, cujos riscos são inexistentes.

3-Não sou obrigado a continuar participando do projeto e posso, a qualquer momento sair do mesmo, sem que isso leve a que eu deixe de ser tratado como os demais pacientes na Instituição.

4-A pesquisa não será feita se houver, relacionados à mesma, qualquer risco para mim. Da mesma forma, caso algum risco proibitivo venha a se revelar no decurso do estudo, o pesquisador se compromete a me alertar sobre o fato e a suspender de imediato minha participação como paciente.

OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

Ribeirão Preto,.....de.....de 200.....

assinatura do paciente ou de seu responsável

Assinatura do médico que obteve o consentimento
(carimbo ou nome legível com CRM)

TESTEMUNHAS NÃO LIGADAS À PESQUISA:

1-.....
assinatura identificação

2-.....
assinatura identificação