CHRISTIAN FERNANDES

**Otimização da extração, separação cromatográfica,
identificação e quantificação de fármacos em fluidos
biológicos**

Tese apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos, da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de doutor em Ciências

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

São Carlos

2006

Sou grato a Deus por este tempo que passou e por ter chegado até aqui. Sou grato pelas lutas, desafios e derrotas. Aprendi e cresci. Sou também grato pelas alegrias e vitórias, fonte de ânimo para continuar. Recorro ao poeta e pastor de ovelhas Davi, quando manifestou sua gratidão a Deus:

“Bendize, ó minha alma, ao Senhor, e tudo que há em mim bendiga o seu santo nome. Bendize, ó minha alma, ao Senhor, e não te esqueças de nem um só dos teus benefícios (...).”

Olho para trás e vejo que nunca estive só. O que hoje colho não é fruto apenas dos meus sonhos e esforço. Reguei, cuidei, mas o crescimento foi dado por Deus. Como Salomão, o rei conhecido pela sua sabedoria, reconheço o desvelo do Pai:

“Se o Senhor não edificar a casa, em vão trabalham os que a edificam; se o Senhor não guardar a cidade, em vão vigia a sentinela. Inútil vos será levantar de madrugada, repousar tarde, comer o pão que penosamente granjeastes; aos seus amados ele o dá enquanto dormem (...).”

À Rafaela,

O cuidado, o estímulo e a confiança não me foram ausentes nesses anos.

O carinho sempre ali, quando precisei.

Hoje sei que seria muito difícil chegar sem você.

Sua alegria me ajudou a caminhar, seu sorriso segurava minhas mãos.

Sonhamos juntos...

Divido com você essa alegria que hoje sinto.

Te amo!

Aos meus pais,

Obrigado pela liberdade de sonhar

Por reconhecer em mim tanto de vocês

Pela casa sempre de portas abertas. Pelo coração aberto...

Pelas alegrias em cada reencontro.

Amo vocês!

Dedico com gratidão este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças, pela orientação e estímulo para a realização deste trabalho. Pela liberdade para expor minhas opiniões e experimentar minha criatividade. Por ter ampliado meus horizontes acadêmico e científico.

Ao Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti, pela amizade e por ter me estimulado a seguir a carreira acadêmica.

À Prof. Dra. Maria Eugênia Costa Queiroz, pelo auxílio no desenvolvimento do método SPME e pelo fornecimento de padrões analíticos.

Aos Profs. Drs. Janete Harumi Yariwake e Carlos Alberto Montanari, pela participação no Exame de Qualificação e pelas valiosas sugestões apresentadas.

Ao Prof. Dr. Pat Sandra, pela orientação em parte do meu doutorado, durante o período que estive em seu laboratório na Universidade de Ghent.

À FAPESP, pelo apoio financeiro e pela bolsa concedida, sem os quais não seria possível a realização deste projeto.

À CAPES, pelo financiamento do meu estágio no exterior.

À todos os colegas do Laboratório de Cromatografia, aos que já passaram e aos que ainda estão aqui. Obrigado pela companhia, momentos descontraídos e auxílio durante o doutorado.

Ao amigo Álvaro, pela amizade, sugestões e parcerias realizadas. Pela disposição em me auxiliar sempre que precisei.

À amiga Claudete, pela sua alegria, companheirismo e pelas discussões técnicas, sempre produtivas.

Ao José Carlos, pela ajuda no desenvolvimento do método SPME-LC para a análise de fluoxetina e norfluoxetina e pelos trabalhos em conjunto.

À Odete Milão, por ser sempre prestativa e amiga. Pela paciência, com a qual sempre tentou solucionar os problemas.

Aos colegas do Pzifer Analytical Research Centre, na Universidade de Ghent, pelo auxílio na realização do meu trabalho.

Às funcionárias da Biblioteca do IQSC, pela atenção e pela correção da tese.

Às funcionárias da Secretaria de Pós-graduação do IQSC, Sílvia e Andréia, pela atenção e por serem sempre solícitas.

Aos funcionários do Laboratório de Cromatografia, pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

À Michelle, minha irmã querida, pela amizade, carinho e incentivo. Você estará sempre no meu coração.

Aos meus amigos Josias e Zozô, pelos bate-papos, cuidado, carinho e incentivo.

Aos meus avós Nilo e Selma, pela amizade e torcida para que eu alcançasse essa conquista. Aos meus avós Manoel e Arminda, pelo carinho.

RESUMO

Este trabalho apresenta o desenvolvimento de diferentes métodos para a determinação de fluoxetina, norfluoxetina e bisfosfonatos, utilizando técnicas modernas de preparo de amostras. Dentre eles, um método simples e sensível, empregando microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia líquida foi desenvolvido para a análise de fluoxetina e norfluoxetina em plasma. As condições de SPME foram otimizadas empregando planejamento fatorial. A extração foi realizada utilizando fibras com PDMS-DVB, e a etapa de dessorção foi realizada em uma nova interface *homemade* com sistema de aquecimento. Extração com sorção em barra de agitação (SBSE) com derivatização *in-situ*, combinada com dessorção com solventes ou dessorção térmica, acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (GC-MS), foi também empregada para a determinação de fluoxetina em plasma. Avaliou-se a derivatização dos analitos *in situ* com cloroformato de etila, bem como os parâmetros tempo de extração, solvente e tempo de dessorção. A combinação de SBSE e LC-MS foi também avaliada. As amostras de plasma foram submetidas à precipitação de proteínas com ácido tricloroacético, extraídas com SBSE, e analisadas por LC-MS. Os métodos SPME-LC, SBSE-GC e SBSE-LC desenvolvidos foram completamente validados, demonstrando serem adequados para analisar fluoxetina em amostras de plasma. Métodos rápidos para a determinação de etidronato, clodronato, pamidronato e alendronato, baseados em cromatografia de troca iônica com detecção indireta no ultravioleta, foram também desenvolvidos. Os métodos são simples e demonstraram precisão, exatidão e especificidade. Além disso, os métodos validados empregam colunas de sílica, mais baratas e de mais disponibilidade do que as colunas poliméricas, frequentemente utilizadas em métodos descritos na literatura para o mesmo propósito.

ABSTRACT

This study describes different methods to analyze fluoxetine, norfluoxetine and bisphosphonates, employing modern sample preparation techniques. A simple and sensitive procedure using solid-phase microextraction (SPME) coupled with liquid chromatography was developed for the analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma samples. SPME conditions were optimized employing a factorial design. The sampling step was performed using a PDMS-DVB fiber and desorption was carried out in a novel homemade heated interface. Stir bar sorptive extraction (SBSE) with in situ derivatization, in combination with either thermal or liquid desorption on-line coupled to gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), was employed for the analysis of fluoxetine. In situ derivatization using ethylchloroformate was evaluated as well as parameters such as solvent polarity, time for analytes desorption, and extraction time. SBSE combined with liquid chromatography and mass spectrometry was also used to analyze fluoxetine in plasma. Plasma samples were first submitted to protein precipitation with trichloroacetic acid, subjected to SBSE, and thereafter analyzed by LC-MS. SPME-LC, SBSE-GC, and SBSE-LC methods were completely validated showing to be adequate to assess fluoxetine in plasma samples. Rapid methods for etidronate, clodronate, pamidronate and alendronate assay were also developed. The methods were based on ion chromatography with indirect ultraviolet detection, which avoids the need for chemical derivatization procedures. The methods were simple, rapid, and demonstrated precision, accuracy, and specificity. Furthermore, they employed silica-based columns, cheaper and more readily available than polymeric columns, frequently used in previous reported methods.

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1.1. Técnicas de preparo de amostras. Adaptado de [7].....	31
Figura 1.2. Dispositivo da fibra de SPME: (A) posição com a fibra retraída na agulha, (B) posição com a fibra exposta. No detalhe são mostradas as dimensões típicas da região com recobrimento de 100 μm [5].....	32
Figura 1.3. Processos de extração e dessorção em uma análise por SPME [5].....	33
Figura 1.4. Modos de extração em SPME: (a) direta, (b) <i>headspace</i> , (c) com proteção de membrana [3].....	35
Figura 1.5. Comparação dos mecanismos de extração por adsorção e absorção. Diagramas da esquerda ilustram os estágios iniciais dos processos e diagramas da direita ilustram a condição de equilíbrio. Adaptado de [9].....	36
Figura 1.6. Esquema bidimensional da interface SPME-LC com aquecimento e esquema tridimensional da interface (corte transversal da câmara de dessorção).....	44
Figura 1.7. Fotografia da interface SPME-LC sem o sistema de aquecimento desenvolvida no Laboratório de Cromatografia da USP de São Carlos.....	44
Figura 1.8. Fotografia da interface SPME-LC com o sistema de aquecimento desenvolvida no Laboratório de Cromatografia da USP de São Carlos.....	45
Figura 1.9. Fotografia da interface SPME-LC com o sistema de aquecimento e detalhe da câmara de dessorção.....	45
Figura 1.10. Interface SPME-LC com sistema de aquecimento ligada ao sistema cromatográfico.....	46
Figura 1.11. Desenho em três dimensões do corpo da câmara de dessorção [13].....	47
Figura 1.12. Esquema da interface SPME demonstrando o modo de dessorção estático, com a válvula nas posições de dessorção e de injeção da amostra [13].....	47
Figura 1.13. Estruturas químicas da (a) fluoxetina, (b) norfluoxetina e (c) clomipramina.....	49
Figura 1.14. Progresso de um simplex bidimensional em direção ao ótimo.....	55
Figura 1.15. Movimentação do método simplex modificado.....	56

Figura 1.16. Cromatograma da mistura teste obtido com coluna C18 150 x 4,6 mm, 3 μm ; fase móvel constituída de acetonitrila:água (70:30), fluxo de 1 mL min^{-1} , temperatura de 35 $^{\circ}\text{C}$ e volume de injeção de 20 μL . (1) naftaleno; (2) bifenila; (3) antraceno; (4) pireno.....	67
Figura 1.17. Cromatograma da mistura teste obtido com coluna C18 50 x 4,6 mm, 3 μm ; fase móvel constituída de acetonitrila:água (50:50), fluxo de 1 mL min^{-1} , temperatura de 35 $^{\circ}\text{C}$ e volume de injeção de 20 μL . (1) Naftaleno; (2) bifenila; (3) antraceno; (4) pireno.....	68
Figura 1.18. Espectro da FLU no ultravioleta.....	69
Figura 1.19. Espectro da CLO no ultravioleta.....	69
Figura 1.20. Cromatograma da mistura FLU (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e CLO (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) obtido com coluna C18 (150 x 4,6 mm, 3 μm); fase móvel constituída de acetonitrila:tampão acetato de amônio 25 mmol L^{-1} adicionado de trietilamina 25 mmol L^{-1} pH 4,6 (70:30), fluxo de 1 mL min^{-1} , temperatura de 35 $^{\circ}\text{C}$, volume de injeção de 20 μL , 227 nm.....	70
Figura 1.21. Cromatograma da mistura FLU (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e CLO (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) obtido com coluna C18 (50 x 4,6 mm, 3 μm); fase móvel constituída de acetonitrila:tampão acetato de amônio 25 mmol L^{-1} adicionado de trietilamina 25 mmol L^{-1} pH 4,6 (70:30), fluxo de 1 mL min^{-1} , temperatura de 35 $^{\circ}\text{C}$, volume de injeção de 20 μL , 227 nm.....	71
Figura 1.22. Cromatograma de plasma fortificado (FLU e nor-FLU a 200 ng mL^{-1} e CLO a 1000 ng mL^{-1}) obtido após extração por SPME nas seguintes condições: fibra PDMS-DVB, 30 minutos, 50 $^{\circ}\text{C}$, sem sal, pH 9,0 e dessorção <i>on-line</i> (60 $^{\circ}\text{C}$).....	71
Figura 1.23. Diagrama de Pareto mostrando os efeitos dos parâmetros avaliados para a fibra PDMS-DVB.....	72
Figura 1.24. Cubo de resposta com valores de área para cada experimento do planejamento fatorial completo para a fibra PDMS-DVB.....	72
Figura 1.25. Diagrama de Pareto do planejamento fatorial completo (2^3) para a fibra PDMS-DVB.....	73
Figura 1.26. Curva de cinética de extração para a fluoxetina nas seguintes condições: fibra PDMS-DVB, 50 $^{\circ}\text{C}$, sem sal, pH 9,0 e agitação a 1100 rpm.....	74
Figura 1.27. Diagrama de Pareto mostrando os efeitos dos parâmetros avaliados para a fibra CW-TPR.....	75
Figura 1.28. Cubo de respostas com valores de área obtidos para nove experimentos para a fibra CW-TPR.....	75

Figura 1.29. Curva de cinética de extração para a fluoxetina nas seguintes condições: fibra CW-TPR, 50 °C, sem sal, pH 11,0 e agitação a 1100 rpm.....	76
Figura 1.30. Cromatogramas de FLU e nor-FLU a 500 ng mL ⁻¹ e CLO a 1000 ng mL ⁻¹ extraídos nas seguintes condições: fibra PDMS-DVB, 30 minutos, 50 °C, sem sal, pH 9,0. Dessorção realizada nos modos <i>off-line</i> e <i>on-line</i> com (60 °C) e sem (25 °C) aquecimento.....	77
Figura 1.31. Efeito da temperatura na dessorção da FLU e nor-FLU.....	78
Figura 1.32. Cromatogramas de plasma branco e plasma fortificado (FLU e nor-FLU a 25 ng mL ⁻¹ e CLO a 1000 ng mL ⁻¹) obtido após extração nas seguintes condições: fibra PDMS-DVB, 30 minutos, 50 °C, sem sal, pH 9.0 e dessorção <i>on-line</i> (60 °C).....	79
 Capítulo 2	
Figura 2.1. Esquema de uma barra SBSE.....	88
Figura 2.2. Recuperação como uma função da razão coeficiente de partição e razão de fases (K_{OW} / β) para extrações por SPME e SBSE. Adaptado de [2].....	90
Figura 2.3. Recuperação teórica de analitos em SBSE e SPME de uma amostra aquosa (10 mL) como função do seu coeficiente de partição octanol-água. Volume de PDMS na fibra SPME: 0,5 µL; volume de PDMS na barra SBSE: 100 µL. Adaptado de [2].....	91
Figura 2.4. Estruturas da fluoxetina (a), desipramina (b) e clomipramina (c).....	95
Figura 2.5. Esquema do sistema de dessorção térmica (adaptado de www.gerstel.com).....	100
Figura 2.6. Cromatograma da FLU e CLO a 1000 ng mL ⁻¹ sem derivatização, modo SIM (m/z 104, 162, 85 e 269).....	106
Figura 2.7. Cromatograma da FLU e CLO a 1000 ng mL ⁻¹ após derivatização com carbonato de sódio e anidrido acético, modo SCAN.....	107
Figura 2.8. Cromatograma da FLU e CLO a 1000 ng mL ⁻¹ após derivatização com etanol-piridina e cloroformato de etila, modo SCAN.....	107
Figura 2.9. Formação de derivado carbamato a partir da FLU e DES.....	108
Figura 2.10. Cromatograma da FLU e CLO a 1000 ng mL ⁻¹ após derivatização com etanol-piridina e cloroformato de etila, modo SCAN.....	108

Figura 2.11. Cromatograma da FLU e CLO a 1000 ng mL ⁻¹ após derivatização com etanol-piridina, cloroformato de etila e tampão borato 100 mmol L ⁻¹ pH 13, modo SCAN.....	109
Figura 2.12. Espectro de massas da CLO não derivatizada.....	109
Figura 2.13. Cromatograma da FLU e CLO a 1000 ng mL ⁻¹ após derivatização com etanol-piridina, cloroformato de etila e carbonato de sódio, modo SCAN.....	110
Figura 2.14. Espectro de massas da FLU após derivatização.....	111
Figura 2.15. Espectro de massas da DES após derivatização.....	111
Figura 2.16. Cromatograma da FLU a 500 ng mL ⁻¹ e DES a 1000 ng mL ⁻¹ após derivatização com etanol-piridina e cloroformato de etila, modo SIM (<i>m/z</i> 116 e 208).....	112
Figura 2.17. Curva de cinética de extração obtida para a FLU e DES.....	114
Figura 2.18. Cromatograma de plasma branco.....	114
Figura 2.19. Curva analítica obtida na análise de FLU em plasma.....	116
Figura 2.20. Cromatograma da FLU a 50 ng mL ⁻¹ e DES a 100 ng mL ⁻¹ obtidos após derivatização e dessorção térmica.....	118
Figura 2.21. Espectro de massas da FLU e DES, modo SCAN (<i>m/z</i> 100-1000).....	120
Figura 2.22. Cromatograma da FLU e DES, com dessorção em metanol e injeção direta.....	121
Figura 2.23. Curva da cinética de extração da FLU e DES.....	122
Figura 2.24. Cromatograma de plasma branco obtido após extração nas condições otimizadas.....	123
Figura 2.25. Curva analítica obtida na análise de FLU em plasma.....	124
Figura 2.26. Cromatograma da FLU na concentração de 10 ng mL ⁻¹ e DES a 100 ng mL ⁻¹	127
Figura 2.27. Cromatograma típico da FLU e DES na concentração de 100 ng mL ⁻¹ ...	127

Capítulo 3

Figura 3.1. Estrutura química do ácido pirofosfórico.....	132
Figura 3.2. Estrutura química geral dos BP's.....	133
Figura 3.3. Cromatograma da solução de clodronato 0,1017 mg mL ⁻¹ e nitrato de cobre II 0,3751 mg mL ⁻¹ . Coluna Alltech de troca aniônica (SAX) 250 x 4,6 mm, 5 µm e fase móvel constituída de ácido nítrico 2,0 mmol L ⁻¹ , 240 nm.....	166
Figura 3.4. Cromatograma da solução de clodronato 0,2018 mg mL ⁻¹ e nitrato de cobre II 0,7502 mg mL ⁻¹ . Coluna Alltech de troca aniônica (SAX) 250 x 4,6 mm, 5 µm e fase móvel constituída de ácido nítrico 2,0 mmol L ⁻¹ , 240 nm.....	167
Figura 3.5. Espectro da solução de ácido nítrico 2,0 mmol L ⁻¹ e cloreto férrico 0,107 mmol L ⁻¹	167
Figura 3.6. Espectro da solução de clodronato 0,2024 mg mL ⁻¹ em ácido nítrico 2,0 mmol L ⁻¹ e cloreto férrico 0,107 mmol L ⁻¹	168
Figura 3.7. Cromatograma da solução de clodronato 0,2024 mg mL ⁻¹ . Coluna Alltech de troca aniônica (SAX) 250 x 4,6 mm, 5 µm e fase móvel constituída de ácido nítrico 2,0 mmol L ⁻¹ e cloreto férrico 0,1070 mmol L ⁻¹	169
Figura 3.8. Cromatograma da solução de alendronato 844 µg mL ⁻¹ obtido com coluna Phenosphere SAX 150 x 4,6 mm, 5 µm, tampão citrato 18 mmol L ⁻¹ pH 4,8 como fase móvel, fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ , temperatura de 30 °C, injeção de 20 µL, comprimento de onda de 220 nm, polaridade normal.....	171
Figura 3.9. Cromatograma da solução de pamidronato 863 µg mL ⁻¹ obtido com coluna Phenosphere SAX 150 x 4,6 mm, 5 µm, tampão citrato 30 mmol L ⁻¹ pH 4,8 como fase móvel, fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ , temperatura de 30 °C, injeção de 20 µL, comprimento de onda de 220 nm, polaridade normal.....	172
Figura 3.10. Cromatograma da solução de etidronato 400 µg mL ⁻¹ obtido com coluna Phenosphere SAX 150 x 4,6 mm, 5 µm, tampão citrato 20 mmol L ⁻¹ pH 4,2 como fase móvel, fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ , temperatura de 30 °C, injeção de 20 µL, comprimento de onda de 226 nm, polaridade invertida.....	173
Figura 3.11. Cromatograma da solução de clodronato 898 µg mL ⁻¹ obtido com coluna Phenosphere SAX 150 x 4,6 mm, 5 µm, tampão citrato 20 mmol L ⁻¹ pH 4,2 como fase móvel, fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ , temperatura de 30 °C, injeção de 20 µL, comprimento de onda de 225 nm, polaridade invertida.....	174

Figura 3.12. Cromatograma da solução de clodronato 906,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtido com coluna Phenosphere SAX 150 x 4,6 mm, 5 μm , ácido nítrico 1 mmol L^{-1} (A):nitrato de sódio 100 mmol L^{-1} (B) (60:40) como fase móvel, fluxo de 1,0 mL min^{-1} , temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$, injeção de 20 μL , comprimento de onda de 243 nm, polaridade normal.....	175
Figura 3.13. Cromatograma da solução padrão de etidronato a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtido com coluna Phenosphere SAX 150 x 2,0 mm, 5 μm , tampão citrato 20 mmol L^{-1} pH 3,6 como fase móvel, fluxo de 0,3 mL min^{-1} , temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$, injeção de 50 μL , 226 nm, polaridade invertida.....	176
Figura 3.14. Representação gráfica da curva padrão de etidronato.....	177
Figura 3.15. Espectros do etidronato, obtidos com detector de DAD, em diferentes pontos do pico.....	178
Figura 3.16. Cromatograma da solução padrão de clodronato 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtido com coluna Phenosphere SAX 150 x 2,0 mm, 5 μm , tampão citrato 20 mmol L^{-1} pH 3,6 como fase móvel, fluxo de 0,3 mL min^{-1} , temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$, injeção de 50 μL , 226 nm, polaridade invertida.....	180
Figura 3.17. Representação gráfica da curva padrão de clodronato.....	181
Figura 3.18. Espectros do etidronato, obtidos com detector de DAD, em diferentes pontos do pico.....	182
Figura 3.19. Cromatograma da solução padrão de pamidronato 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtido com coluna Sphereclone SAX 250 x 2,0 mm, 5 μm , tampão citrato 20 mmol L^{-1} pH 4,6 como fase móvel, fluxo de 0,25 mL min^{-1} , temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$, injeção de 50 μL , 222 nm, polaridade invertida.....	184
Figura 3.20. Representação gráfica da curva padrão de pamidronato.....	185
Figura 3.21. Espectros do pamidronato, obtidos com detector de DAD, em diferentes pontos do pico.....	186
Figura 3.22. Cromatograma da solução padrão de alendronato 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtido com coluna Sphereclone SAX 250 x 2,0 mm, 5 μm , tampão citrato 20 mmol L^{-1} pH 4,6 como fase móvel, fluxo de 0,25 mL min^{-1} , temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$, injeção de 50 μL , 222 nm, polaridade invertida.....	189
Figura 3.23. Representação gráfica da curva padrão de alendronato.....	190
Figura 3.24. Espectros do pamidronato, obtidos com detector de DAD, em diferentes pontos do pico.....	190

Figura 3.25. Cromatograma da solução do medicamento referência 300,37 $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtido com coluna Sphereclone SAX 250 x 2,0 mm, 5 μm , tampão citrato 20 mmol L^{-1} pH 4,6 como fase móvel, fluxo de 0,25 mL min^{-1} , temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$, injeção de 50 μL , 222 nm, polaridade invertida.....	193
Figura 3.26. Cromatograma da solução do medicamento genérico 300,21 $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtido com coluna Sphereclone SAX 250 x 2,0 mm, 5 μm , tampão citrato 20 mmol L^{-1} pH 4,6 como fase móvel, fluxo de 0,25 mL min^{-1} , temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$, injeção de 50 μL , 222 nm, polaridade invertida.....	194
Figura 3.27. Cubo de respostas obtido na otimização das condições do espectrômetro de massas.....	199
Figura 3.28. Diagrama de Pareto obtido na otimização de parâmetros do espectrômetro de massas.....	200
Figura 3.29. Cromatograma do padrão analítico de alendronato na concentração de 26,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nas condições otimizadas.....	200
Figura 3.30. Espectro do padrão de alendronato na concentração de 26,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nas condições otimizadas.....	201

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1.1. Fibras para SPME disponíveis comercialmente: usos, propriedades e aplicações.....	39
Tabela 1.2. Matriz de planejamento [36].....	58
Tabela 1.3. Planejamento fatorial fracionado (2^{4-1}) usado para otimizar as condições de extração em SPME.....	65
Tabela 1.4. Valores de concentração e DPR% obtidos na avaliação da precisão intra-dia e entre-dias.....	80
Tabela 1.5. Valores de recuperação para FLU e nor-FLU obtidos nas três concentrações avaliadas.....	81

Capítulo 2

Tabela 2.1. Barras SBSE disponíveis comercialmente.....	88
Tabela 2.2. Valores de área e DPR obtidos na avaliação da precisão intra-dia.....	115
Tabela 2.3. Valores de área e DPR obtidos na avaliação da precisão inter-dias.....	115
Tabela 2.4. Valores de área obtidos na avaliação da linearidade.....	116
Tabela 2.5. Valores de área e DPR obtidos na avaliação da precisão com sistema de dessorção térmica.....	117
Tabela 2.6. Tempos de retenção da FLU, DES e CLO utilizando diferentes fases móveis.....	120
Tabela 2.7. Valores de área e relação sinal-ruído obtidos na otimização do detector de massas.....	123
Tabela 2.8. Valores de área e DPR usados na avaliação da linearidade.....	124
Tabela 2.9. Valores de área e DPR usados no cálculo da precisão intra-dia.....	125
Tabela 2.10. Valores de área e DPR usados no cálculo da precisão inter-dias.....	125

Tabela 2.11. Valores de área e recuperação encontrados para a FLU.....	126
---	-----

Tabela 2.12. Valores de área e recuperação encontrados para a DES.....	126
---	-----

Capítulo 3

Tabela 3.1. BP's e suas respectivas potências anti-reabsortivas relativas em modelos <i>in vivo</i>	135
--	-----

Tabela 3.2. Valores típicos de rendimento da síntese dos BP's para diferentes ácidos carboxílicos.....	139
---	-----

Tabela 3.3. BP's obtidos a partir de diferentes lactamas e compostos carbonílicos.....	142
---	-----

Tabela 3.4. Composição do tampão citrato de sódio em diferentes pH's.....	156
--	-----

Tabela 3.5. Composição de fase móvel constituída de ácido nítrico:nitrato de sódio em diferentes proporções e diferentes valores de pH.....	157
--	-----

Tabela 3.6. Matriz de planejamento empregada para otimização das condições de voltagem do capilar, voltagem do cone e energia do íon.....	165
--	-----

Tabela 3.7. Tempos de retenção dos picos do alendronato e do sistema utilizando tampão citrato 30 mmol L ⁻¹	170
---	-----

Tabela 3.8. Tempos de retenção dos picos do etidronato e do sistema utilizando tampão citrato 30 mmol L ⁻¹	173
--	-----

Tabela 3.9. Tempos de retenção dos picos do clodronato e do sistema utilizando tampão citrato 30 mmol L ⁻¹	174
--	-----

Tabela 3.10. Valores de área obtidos para a construção da curva padrão de etidronato.....	177
--	-----

Tabela 3.11. Valores de área e DPR obtidos para o cálculo da repetibilidade.....	178
---	-----

Tabela 3.12. Valores de área e DPR obtidos para o cálculo da precisão intermediária.....	179
---	-----

Tabela 3.13. Valores de área obtidos para a construção da curva padrão de clodronato.....	181
--	-----

Tabela 3.14. Valores de área e DPR obtidos para o cálculo da repetibilidade.....	182
---	-----

Tabela 3.15. Valores de área e DPR obtidos para o cálculo da precisão intermediária.....	183
---	-----

Tabela 3.16. Valores de área obtidos para a construção da curva padrão de pamidronato.....	185
Tabela 3.17. Valores de área e DPR obtidos para o cálculo da repetibilidade.....	187
Tabela 3.18. Valores de área e DPR obtidos para o cálculo da precisão intermediária.....	187
Tabela 3.19. Valores de altura obtidos para a construção da curva padrão de alendronato.....	189
Tabela 3.20. Valores de altura e DPR obtidos para o cálculo da repetibilidade.....	191
Tabela 3.21. Valores de altura e DPR obtidos para o cálculo da precisão intermediária.....	191
Tabela 3.22. Valores de altura e recuperação obtidos para o cálculo da exatidão.....	192
Tabela 3.23. Valores de altura e teor obtidos para o medicamento referência.....	194
Tabela 3.24. Valores de altura e teor obtidos para o medicamento genérico.....	195
Tabela 3.25. Valores de área, tempo de retenção e relação sinal/ruído obtidos para as diferentes fases móveis avaliadas na determinação de alendronato.....	196
Tabela 3.26. Valores de área, tempo de retenção e relação sinal/ruído obtidos para as diferentes fases móveis avaliadas na determinação de pamidronato.....	197
Tabela 3.27. Valores de área obtidos na otimização das condições de gás de secagem e de nebulização.....	198

Lista de Esquemas

Capítulo 2

Esquema 2.1. Esquema geral de acilação de aminas primárias e secundárias com anidridos ácidos. R = grupo alquila ou arila..... 93

Esquema 2.2. Esquema geral de formação de derivados carbamatos. R = grupo alquila ou arila..... 94

Capítulo 3

Esquema 3.1. Síntese do etidronato..... 138

Esquema 3.2. Reação entre ácido carboxílico e ácido fosforoso na presença de tricloreto de fósforo..... 139

Esquema 3.3. Síntese de BP's a partir de ácidos graxos de cadeia pequena (n = 1, 2, 3 e 4)..... 140

Esquema 3.4. Síntese de BP's por meio da reação entre o cloreto de acila e o tris(trimetilsilil)fosfito..... 140

Esquema 3.5. Síntese de cloretos de acila..... 141

Esquema 3.6. Síntese de BP's através de uma reação de bis-hidrofosforilação catalisada por paládio: (a) síntese do alcino terminal; (b) síntese do fosfito de dialquila; (c) reação do alcino terminal com fosfito de dialquila..... 141

Esquema 3.7. Síntese de BP's utilizando íons enolato como intermediários..... 142

Esquema 3.8. Síntese de BP's derivados de α -aminoácidos..... 143

Esquema 3.9. Síntese do 2-aminociclopropilideno-1,1-bisfosfonato de tetraetila..... 144

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ESQUEMAS

INTRODUÇÃO GERAL.....	26
------------------------------	-----------

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO.....	29
1.1 PREPARO DE AMOSTRAS.....	29
1.2 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME).....	31
1.2.1 Características da SPME.....	31
1.2.2 Modos de extração.....	34
1.2.3 Mecanismos de extração.....	35
1.2.4 Parâmetros experimentais que afetam a eficiência da extração.....	37
1.2.4.1 Fase extratora.....	37
1.2.4.2 Tempo.....	39
1.2.4.3 Temperatura.....	40
1.2.4.4 Força iônica.....	40
1.2.4.5 pH.....	41
1.2.4.6 Agitação da amostra.....	42
1.2.5 Dessorção dos analitos.....	43
1.3 FLUOXETINA.....	48
1.3.1 Farmacodinâmica e farmacocinética.....	48
1.3.2 Análise em fluidos biológicos.....	50
1.4 PREPARO DE COLUNAS PARA HPLC.....	51
1.5 PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS.....	52
1.5.1 Método univariado.....	53
1.5.2 Método simplex.....	54

1.5.2.1 Simplex Básico.....	54
1.5.2.2 Simplex Modificado.....	56
1.5.2.3 Simplex Supermodificado.....	56
1.5.3 Método do planejamento fatorial.....	57
1.5.4 Método de análise de superfície de resposta.....	59
2 OBJETIVOS.....	59
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	60
3.1 PADRÕES E REAGENTES.....	60
3.2 MATERIAIS.....	61
3.3 EQUIPAMENTOS.....	61
3.4 MÉTODOS.....	62
3.4.1 Empacotamento de colunas C18.....	62
3.4.2 Preparo dos padrões analíticos.....	63
3.4.3 Condições cromatográficas.....	63
3.4.4 Otimização das condições de extração por SPME.....	64
3.4.5 Validação.....	66
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
4.1 EMPACOTAMENTO DE COLUNAS C18.....	67
4.2 ANÁLISE DE FLU e nor-FLU POR HPLC-UV.....	68
4.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR SPME.....	72
4.4 VALIDAÇÃO.....	79
4.4.1 Especificidade.....	79
4.4.2 Linearidade e faixa de trabalho.....	79
4.4.3 Precisão.....	80
4.4.4 Limites de quantificação e detecção.....	80
4.4.5 Recuperação.....	80
5 CONCLUSÕES.....	81
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

CAPÍTULO 2

1 INTRODUÇÃO.....	88
1.1 EXTRAÇÃO POR SORÇÃO EM BARRA DE AGITAÇÃO (SBSE).....	88
1.2 DERIVATIZAÇÃO DE AMINAS.....	92
2 OBJETIVOS.....	94
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	95
3.1 PADRÕES E REAGENTES.....	95
3.2 MATERIAIS.....	96
3.3 EQUIPAMENTOS.....	96
3.4 MÉTODO SBSE-GC-MS.....	97
3.4.1 Precipitação das proteínas do plasma.....	97
3.4.2 Derivatização dos analitos.....	97
3.4.3 Condições cromatográficas.....	99
3.4.4 Procedimento para amostras de plasma.....	99
3.4.5 Otimização do método.....	100
3.4.6 Validação.....	101
3.5 MÉTODO SBSE-LC-MS.....	102
3.5.1 Condições cromatográficas.....	102
3.5.2 Precipitação das proteínas do plasma.....	103
3.5.3 Procedimento para amostras de plasma.....	103
3.5.4 Extração e dessorção.....	103
3.5.5 Otimização das condições do detector de massas.....	104
3.5.6 Validação.....	104
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	105
4.1 MÉTODO SBSE-GC-MS.....	105
4.1.1 Precipitação das proteínas do plasma.....	105
4.1.2 Derivatização dos analitos.....	106
4.1.3 Otimização do método.....	112
4.1.4 Validação.....	114
4.1.5 Dessorção térmica.....	117
4.2 MÉTODO SBSE-LC-MS.....	118
4.2.1 Condições cromatográficas.....	118

4.2.2 Extração e dessorção.....	121
4.2.3 Otimização das condições do detector de massas.....	122
4.2.4 Validação.....	123
5 CONCLUSÕES.....	128
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129

CAPÍTULO 3

1 INTRODUÇÃO.....	132
1.1 FARMACOLOGIA.....	134
1.1.1 Farmacodinâmica.....	134
1.1.2 Farmacocinética.....	137
1.2 SÍNTESE.....	138
1.3 ANÁLISE.....	144
1.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	145
1.3.2 Cromatografia Gasosa.....	149
1.3.3 Eletroforese Capilar.....	150
1.3.4 Outros métodos.....	151
2 OBJETIVOS.....	151
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	152
3.1 PADRÕES E REAGENTES.....	152
3.2 EQUIPAMENTOS.....	153
3.3 MÉTODOS.....	154
3.3.1 Cromatografia iônica com complexação in-line com íons cobre.....	154
3.3.2 Cromatografia iônica com complexação in-line com íons ferro.....	154
3.3.3 Cromatografia iônica com detecção indireta no ultravioleta.....	155
3.3.3.1 Testes iniciais e otimização.....	155
3.3.3.1.1 Alendronato.....	155
3.3.3.1.2 Pamidronato.....	157
3.3.3.1.3 Etidronato.....	157
3.3.3.1.4 Clodronato.....	158
3.3.3.2 Validação.....	159

3.3.3.2.1 Linearidade e faixa de trabalho.....	160
3.3.3.2.2 Especificidade.....	160
3.3.3.2.3 Precisão.....	160
3.3.3.2.4 Limite de quantificação.....	161
3.3.3.2.5 Limite de detecção.....	161
3.3.3.2.6 Exatidão.....	161
3.3.3.2.7 Robustez.....	162
3.3.3.2.8 Determinação de alendronato no produto acabado.....	162
3.3.4 Determinação de alendronato e pamidronato por LC-MS.....	163
3.3.4.1 Otimização das condições cromatográficas.....	163
3.3.4.2 Otimização das condições do espectrômetro de massas.....	163
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	165
4.1 CROMATOGRAFIA IÔNICA COM COMPLEXAÇÃO IN-LINE COM ÍONS COBRE.....	165
4.2 CROMATOGRAFIA IÔNICA COM COMPLEXAÇÃO IN-LINE COM ÍONS FERRO.....	167
4.3 CROMATOGRAFIA IÔNICA COM DETECÇÃO INDIRETA NO UV.....	169
4.3.1 Testes iniciais e otimização.....	169
4.3.1.1 Alendronato.....	169
4.3.1.2 Pamidronato.....	171
4.3.1.3 Etidronato.....	172
4.3.1.4 Clodronato.....	173
4.3.2 Validação.....	175
4.3.2.1 Etidronato.....	175
4.3.2.1.1 Linearidade e faixa de trabalho.....	175
4.3.2.1.2 Especificidade.....	177
4.3.2.1.3 Precisão.....	178
4.3.2.1.4 Limite de quantificação.....	179
4.3.2.1.5 Limite de detecção.....	179
4.3.2.1.6 Exatidão.....	179
4.3.2.1.7 Robustez.....	180

4.3.2.2 Clodronato.....	180
4.3.2.2.1 Linearidade e faixa de trabalho.....	180
4.3.2.2.2 Especificidade.....	181
4.3.2.2.3 Precisão.....	182
4.3.2.2.4 Limite de quantificação.....	183
4.3.2.2.5 Limite de detecção.....	183
4.3.2.2.6 Exatidão.....	183
4.3.2.2.7 Robustez.....	184
4.3.2.3 Pamidronato.....	184
4.3.2.3.1 Linearidade e faixa de trabalho.....	184
4.3.2.3.2 Especificidade.....	186
4.3.2.3.3 Precisão.....	186
4.3.2.3.4 Limite de quantificação.....	187
4.3.2.3.5 Limite de detecção.....	188
4.3.2.3.6 Exatidão.....	188
4.3.2.3.7 Robustez.....	188
4.3.2.4 Alendronato.....	188
4.3.2.4.1 Linearidade e faixa de trabalho.....	188
4.3.2.4.2 Especificidade.....	190
4.3.2.4.3 Precisão.....	191
4.3.2.4.4 Limite de quantificação.....	192
4.3.2.4.5 Limite de detecção.....	192
4.3.2.4.6 Exatidão.....	192
4.3.2.4.7 Robustez.....	193
4.3.2.4.8 Determinação de alendronato no produto acabado.....	193
4.4 DETERMINAÇÃO DE ALENDRONATO E PAMIDRONATO POR LC-MS.....	195
4.4.1 Otimização das condições cromatográficas.....	195
4.4.2 Otimização das condições do espectrômetro de massas.....	197

5 CONCLUSÕES.....	202
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	204
CONCLUSÃO GERAL.....	213

INTRODUÇÃO GERAL

A identificação e a quantificação de fármacos em fluidos biológicos têm importância fundamental em estudos de farmacocinética, na avaliação de novas formas farmacêuticas, na monitorização terapêutica e em estudos de bioequivalência para estabelecimento de medicamentos genéricos.

A análise de fármacos em meio biológico compreende as etapas de extração do composto de interesse, separação de interferentes e detecção, onde se pode obter informações a respeito da quantidade e a identidade do fármaco.

A etapa de extração ou preparo da amostra pode ser realizada por várias técnicas, sendo a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE) bastante utilizadas. Técnicas mais recentes como a microextração em fase sólida (SPME) e a extração por sorção em barras de agitação (SBSE) têm sido desenvolvidas visando reduzir o tempo gasto na análise, além de eliminar o consumo de solventes orgânicos.

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) tem sido muito utilizada na separação, identificação e quantificação de fármacos. Combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) e da espectrometria de massas (informação estrutural e aumento da seletividade).

O presente trabalho foi dividido em três capítulos, onde foram desenvolvidos diferentes métodos para a análise de duas classes diferentes de fármacos: inibidores seletivos da recaptção de serotonina (fluoxetina e norfluoxetina, seu principal metabólito) e bisfosfonatos (alendronato, clodronato, etidronato e pamidronato).

O **Capítulo 1** descreve o desenvolvimento de um método para a determinação de fluoxetina e norfluoxetina em plasma empregando o acoplamento SPME-LC-UV. As condições cromatográficas foram otimizadas, tendo sido empregadas colunas empacotadas no

próprio laboratório. Os diferentes parâmetros que afetam a extração por SPME foram avaliados, empregando-se planejamento fatorial. Uma nova interface *homemade* foi utilizada para o acoplamento SPME-LC, apresentando vantagens sobre a interface comercial e sobre a dessorção realizada no modo *off-line*. O método foi completamente validado tendo se mostrado adequado para a análise de fluoxetina e norfluoxetina em plasma.

No **Capítulo 2** descreve-se o desenvolvimento de métodos para a análise de fluoxetina em plasma empregando os acoplamentos SBSE-GC-MS e SBSE-LC-MS. Para o sistema SBSE-GC-MS foram avaliados diferentes agentes precipitantes para as proteínas do plasma e diferentes reagentes de derivatização para a fluoxetina e a desipramina, usada como padrão interno. Foram otimizadas as condições de extração e o método foi validado. Foi feita uma comparação dos resultados obtidos com dessorção com solventes e dessorção térmica. Para o sistema SBSE-LC-MS, as condições cromatográficas e as condições de extração foram otimizadas. Os parâmetros que afetam a sensibilidade no detector MS foram também estudados. O método foi validado, tendo apresentado especificidade, linearidade, precisão e sensibilidade adequados para a determinação de fluoxetina em amostras de plasma.

O **Capítulo 3** apresenta o desenvolvimento de métodos para a análise de quatro diferentes bisfosfonatos: alendronato, clodronato, etidronato e pamidronato. Foram desenvolvidos métodos para a análise destes fármacos em matéria-prima e em produto acabado, empregando cromatografia de troca iônica e detecção indireta no ultravioleta. Buscou-se, também, desenvolver um método para a análise destes fármacos em meio biológico empregando o sistema LC-MS.

1

Microextração em fase sólida (SPME) na determinação de fluoxetina e norfluoxetina em plasma

A consciência do mundo e a consciência de si como
ser inacabado necessariamente inscrevem o ser
consciente de sua inconclusão num permanente
movimento de busca (...).

Paulo Freire

1

Microextração em fase sólida (SPME) na determinação de fluoxetina e norfluoxetina em plasma

1 INTRODUÇÃO

1.1 PREPARO DE AMOSTRAS

Nas últimas décadas muito esforço tem sido despendido com o objetivo de otimizar as condições de análise, diminuindo o tempo gasto para sua execução, aumentando a resolução e desenvolvendo sistemas de automação. Além disso, tem-se buscado maior desenvolvimento da instrumentação e do sistema de aquisição de dados. A utilização de bombas de alta precisão, capazes de gerar fluxos reprodutíveis, sem pulsos nos modos isocrático e gradiente, aliadas ao uso de injetores de pequeno volume, colunas com micropartículas e sistemas de detecção altamente sensíveis, têm feito da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) uma técnica amplamente utilizada, rápida, reprodutível e com alta resolução. A utilização de sistemas de aquisição e tratamento de dados tem melhorado a qualidade dos dados obtidos, sendo sua interpretação uma tarefa simples.

Por outro lado, o preparo de amostras não tem recebido a mesma atenção, particularmente no que se refere à sua automação. Ainda hoje são utilizados métodos manuais utilizados a décadas, e que requerem muito tempo para sua execução. Em muitos casos, enquanto o procedimento analítico leva alguns poucos minutos para ser realizado, o preparo da amostra pode levar até algumas horas.

Um estudo realizado com um grande número de técnicas de preparo de amostras demonstrou que cerca de 60% do tempo total de análise é gasto no preparo da amostra, enquanto apenas cerca de 6% são consumidos para a determinação dos seus constituintes. Além de ser a etapa mais demorada do processo de análise de uma amostra, é também a mais susceptível à introdução de erros [1,2].

Dessa forma, tem-se buscado, nos últimos anos, o desenvolvimento de técnicas mais rápidas de preparo de amostras, principalmente para a análise de amostras complexas. Além da rapidez, outras características requeridas para um bom método de preparo de amostras são a simplicidade, baixo custo, repetibilidade e ausência de solventes orgânicos, dentre outras. Algumas técnicas atuais, como extração com fluido supercrítico (SFE) e extração acelerada com solvente (ASE), têm cumprido alguns destes requisitos. Apesar da vantagem destas técnicas sobre aquelas clássicas, como extração líquido-líquido e extração com soxhlet, ainda continuam necessitando de grande quantidade de solvente para sua execução [3,4].

Os métodos de preparo de amostras objetivam isolar e concentrar os analitos a níveis adequados, e obter um nível de limpeza da amostra que não comprometa a sua análise química, pois matrizes na forma bruta podem gerar interferências e incompatibilidades com equipamentos analíticos [5].

Os métodos de preparo de amostras podem ser classificados de acordo com a fase extratora como gasosa, líquida ou sólida (Figura 1.1), sendo as principais: *headspace*, extração com fluido supercrítico (SFE), extração acelerada com solvente (ASE), extração com água sub-crítica (SWE), extração líquido-líquido (LLE), extração com solventes assistida por microondas (MASE), extração com soxhlet, extração em fase sólida (SPE), dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), microextração em fase sólida (SPME) e extração por sorção em barra de agitação (SBSE) [2,3,6].

Figura 1.1. Técnicas de preparo de amostras. Adaptado de [7].

1.2 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

1.2.1 Características da SPME

A SPME é uma técnica de preparo de amostras que possui a maioria dos requisitos necessários para uma técnica considerada ideal. Apesar de recente, a SPME tem encontrado um grande número de aplicações nos últimos anos, tendo crescido acentuadamente o número de publicações empregando esta técnica. Foi desenvolvida inicialmente para a análise de compostos voláteis na área ambiental mas, ultimamente, tem sido aplicada na análise de uma grande variedade de matrizes sólidas, líquidas e gasosas, e para diversos analitos, de voláteis a não voláteis [3].

A SPME foi desenvolvida com o objetivo de facilitar o preparo de amostras, tornando rápido este processo. Os primeiros experimentos utilizando este conceito de extração foram realizados no início da década de 1990, utilizando uma seção de fibra óptica de sílica fundida, recoberta ou não com fases poliméricas líquidas ou sólidas, mergulhadas em uma solução aquosa contendo os analitos. Posteriormente, as fibras eram introduzidas em um cromatógrafo gasoso [7,8].

É uma microtécnica, na qual os processos de extração e concentração dos analitos ocorrem em escala dimensional reduzida. O dispositivo mais comum de SPME consiste de um bastão de fibra óptica, de sílica fundida de 100 μm de diâmetro, com 10 mm de uma das extremidades recoberto com um filme fino de um polímero (Figura 1.2), como polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA) ou carbowax (CW), ou de um sólido adsorvente, como carvão ativo microparticulado (Carboxen). As espessuras dos recobrimentos das fibras comerciais variam de 7 μm a 100 μm e seus volumes de 0,03 μL a 0,7 μL [5].

Figura 1.2. Dispositivo da fibra de SPME: (A) posição com a fibra retraída na agulha, (B) posição com a fibra exposta. No detalhe são mostradas as dimensões típicas da região com recobrimento de 100 μm [5].

A SPME baseia-se na sorção dos analitos em uma fibra com pequeno diâmetro, revestida com um sorbente. Esta técnica possui duas etapas: partição dos analitos entre a fibra extratora e a matriz e dessorção do extrato concentrado no instrumento analítico (Figura 1.3). Na primeira etapa, a fibra recoberta com material extrator é colocada em contato com a matriz ou com o *headspace*, permitindo que haja partição dos analitos entre a matriz e a fibra. Posteriormente, a fibra contendo os analitos é transferida para um instrumento para que ocorra a dessorção, separação e quantificação dos mesmos [7].

Figura 1.3. Processos de extração e dessorção em uma análise por SPME [5].

O processo de extração envolve a partição dos analitos entre a matriz e a fibra extratora. No equilíbrio, a quantidade extraída é proporcional ao coeficiente de partição e à concentração do analito na amostra. O coeficiente de partição é determinado pela interação entre o analito e a matriz, e entre o analito e a fase extratora. A extração é considerada completa quando a concentração do analito atinge o equilíbrio de distribuição entre a fase estacionária e a matriz não havendo, dessa forma, uma extração exaustiva. A condição de equilíbrio pode ser descrita pela equação:

$$N = \frac{K_{fs} V_f V_s C_0}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (1)$$

onde N é a quantidade extraída pela fibra, K_{fs} é o coeficiente de partição entre a fase extratora e a matriz, V_f é o volume da fase extratora, V_s é o volume da amostra e C_0 é a concentração inicial de um dado analito na amostra. A equação demonstra que há uma relação proporcional direta entre a concentração da amostra e a quantidade de analito extraída, sendo esta a base para a quantificação dos analitos. A extração exaustiva pode ser alcançada para amostras de volumes pequenos, quando a constante de distribuição possui um valor elevado.

1.2.2 Modos de extração

Três tipos de extração podem ser realizados utilizando SPME: direta, *headspace* e com proteção de membrana (Figura 1.4). No modo de extração direta, a fibra extratora é imersa diretamente na amostra e os analitos são transportados diretamente da matriz para a fase extratora. Para facilitar uma rápida extração, alguma agitação é requerida para transportar os analitos da matriz para a superfície da fibra.

No modo *headspace*, os analitos precisam ser transportados através de uma barreira de ar antes de atingir a fase extratora. Esta modificação serve, primariamente, para proteger a fibra de danos causados por moléculas de elevada massa molecular, e outros interferentes não-voláteis presentes na matriz.

Finalmente, pode-se utilizar o modo protegido por membrana, cujo principal objetivo é proteger a fibra contra danos, similar ao uso do *headspace* quando utilizado para amostras muito sujas. No entanto, este modo é mais indicado para analitos que possuem baixa

volatilidade. Além disso, membranas feitas de materiais apropriados podem originar um certo grau de seletividade ao processo de extração [7].

Figura 1.4. Modos de extração em SPME: (a) direta, (b) *headspace*, (c) com proteção de membrana [3].

1.2.3 Mecanismos de extração

Existem dois tipos diferentes de recobrimentos para SPME disponíveis no mercado. O mais utilizado é o polidimetilsiloxano (PDMS), que é um recobrimento líquido. Embora pareça um sólido é, na verdade, uma goma de elevada viscosidade. Poliacrilato (PA) é um recobrimento sólido cristalino que se transforma em líquido nas temperaturas de dessorção. PDMS e PA extraem os analitos pelo processo de absorção. Os outros recobrimentos, incluindo polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB), Carbowax-DVB (CW-DVB), CW-TPR (template resin – DVB com tamanhos de poros uniformes) são fases mistas, onde a fase extratora é um sólido poroso, extraíndo os analitos por meio de adsorção [9]. A Figura 1.5 ilustra os estágios inicial e final dos processos de extração por adsorção e absorção.

Figura 1.5. Comparação dos mecanismos de extração por adsorção e absorção. Diagramas da esquerda ilustram os estágios iniciais dos processos e diagramas da direita ilustram a condição de equilíbrio. Adaptado de [9].

Independentemente da natureza do recobrimento, as moléculas do analito se ligam inicialmente na sua superfície. Posteriormente, o que determinará se os analitos migrarão para o interior do recobrimento, ou permanecerão na sua superfície, será a magnitude dos seus coeficientes de difusão no recobrimento. Os coeficientes de difusão de moléculas orgânicas em PDMS são próximos daqueles em solventes orgânicos; portanto, a difusão em PDMS é relativamente rápida, e esse material extrai via absorção. Os coeficientes de difusão em PA são uma ordem de magnitude menores, mas suficientemente altos para o mecanismo primário de extração ser a absorção. Por outro lado, os coeficientes de difusão de moléculas orgânicas em divinilbenzeno e Carboxen são muito pequenos, e nos tempos normalmente empregados nas análises por SPME todas as moléculas tendem a permanecer na superfície do recobrimento [9].

Nos recobrimentos sólidos porosos, a extração dos analitos é feita principalmente por interações intermoleculares fracas. O número de sítios ativos é limitado; quando todos os

sítios estão ocupados os analitos não podem mais ser aprisionados. Isso significa que a dependência entre a concentração de um analito na amostra e a quantidade extraída por uma fibra SPME não pode ser linear em uma ampla faixa de concentração. Além disso, enquanto a absorção é um processo não competitivo, adsorção é competitiva e uma molécula com afinidade maior pelo recobrimento pode deslocar uma molécula com menor afinidade. Dessa forma, a quantidade de analito extraída por uma fibra pode ser significativamente afetada pela composição da matriz da amostra [9].

1.2.4 Parâmetros experimentais que afetam a eficiência da extração

Vários parâmetros experimentais influenciam a quantidade de analito extraído da matriz para a fase extratora e, por isso, devem ser avaliados e otimizados para que se obtenha o máximo desempenho da técnica. Dentre os fatores que influenciam a quantidade de analito extraída incluem-se as características da fase extratora, temperatura, tempo de extração, força iônica do meio, quantidade de solvente orgânico, pH e velocidade de agitação [10].

1.2.4.1 Fase extratora

A afinidade da fase extratora por um analito é o fator mais importante no desenvolvimento de um método utilizando SPME. A seleção da fase é baseada, principalmente, na polaridade e volatilidade do analito [10].

A SPME é uma técnica sensível devido ao fator de concentração obtido pelas fibras, e seletiva devido aos diferentes materiais utilizados para revestir as mesmas. A Equação 1 demonstra que a eficiência do processo de extração é dependente do coeficiente de distribuição K_{fs} , o qual é um parâmetro característico que descreve as propriedades de uma

fase extratora e sua seletividade para os analitos em relação aos outros componentes da amostra. O volume da fase estacionária determina a sensibilidade do método afetando, também, o tempo necessário para atingir o equilíbrio. Dessa forma, é possível aumentar a quantidade de analito extraída aumentando-se o volume da fase estacionária. A seletividade, por sua vez, é dependente da espessura e características físico-químicas da fase extratora. Como regra geral pode-se aplicar o princípio “semelhante dissolve semelhante”, isto é, que compostos polares são extraídos por fases extratoras polares e compostos apolares são extraídos por fases extratoras apolares [3,7,11].

Deve-se salientar que a Equação 1 é válida para os recobrimentos absorbtivos como PDMS e PA. Para os sorbentes sólidos (PDMS-DVB, CW-DVB e CW-TPR), a equação leva em conta o número de sítios ativos disponíveis para extração [12].

$$N = \frac{KC_s^0 V_s V_f (C_{f \max} - C_f^\infty)}{V_s + KV_f (C_{f \max} - C_f^\infty)} \quad (2)$$

onde $C_{f \max}$ é a concentração máxima de sítios ativos no recobrimento, C_f^∞ é a concentração de equilíbrio do analito na fibra e K é a constante de equilíbrio de adsorção do analito.

No início do desenvolvimento da SPME, apenas fibras para cromatografia gasosa (GC) eram disponíveis, mas atualmente já existem também fibras projetadas para HPLC. Como nesta técnica a dessorção é feita pela fase móvel, a qual geralmente é composta de solvente orgânico, apenas fases ligadas quimicamente ao capilar e estáveis a estes solventes orgânicos, podem ser usadas neste processo [3].

Na Tabela 1.1 são apresentadas as fibras para SPME disponíveis comercialmente, algumas propriedades, usos e aplicações.

Tabela 1.1. Fibras para SPME disponíveis comercialmente: usos, propriedades e aplicações.

Fibra	Espessura do filme (μm)	Uso recomendado	Aplicações
PDMS	100 <i>b</i>	GC/HPLC	Voláteis
	30 <i>b</i>	GC/HPLC	Semivoláteis não-polares
	7 <i>a</i>	GC/HPLC	Não polares de alto PM
PDMS-DVB	65 <i>a</i>	GC	Voláteis, aminas e nitroaromáticos
StableFlex	60 <i>a</i>	HPLC	Aminas e compostos polares
	65 <i>a</i>	GC	Voláteis, aminas e nitroaromáticos
PA	85 <i>a</i>	GC/HPLC	Semivoláteis polares
Carboxen-PDMS	75 <i>a</i>	GC	Gases e compostos de baixo PM
StableFlex	85 <i>a</i>	GC	Gases e compostos de baixo PM
CW-DVB	65 <i>a</i>	GC	Álcoois e compostos polares
StableFlex	70 <i>a</i>	GC	Álcoois e compostos polares
CW-TR	50 <i>a</i>	HPLC	Surfactantes e compostos polares
StableFlex			
DVB/Carboxen/ PDMS	50/30 <i>a</i>	GC	Análise de traços

a: fase ligada; *b*: fase não ligada

1.2.4.2 Tempo

A quantidade máxima de um analito extraído é obtida quando o equilíbrio de partição do analito entre a fibra e o meio que o envolve for estabelecido. O tempo de extração é definido como o tempo necessário para que o equilíbrio entre as fases seja estabelecido. Para compostos que possuem coeficiente de partição menor, o tempo necessário para atingir o equilíbrio é longo e, neste caso, é conveniente que o tempo de extração seja inferior ao tempo necessário para se atingir o equilíbrio. É importante que o tempo de extração seja rigorosamente controlado para que os resultados obtidos sejam reproduzíveis. É comum que se construa uma curva relacionando o tempo com a quantidade extraída do analito, obtendo-se informações a respeito da cinética de extração [3,5,7]. Para a maioria dos fármacos determinados em plasma, o equilíbrio de extração é alcançado entre 15 e 30 minutos [10].

1.2.4.3 Temperatura

A influência da temperatura na eficiência da extração por SPME pode ser avaliada em termos do coeficiente de partição. Se ocorrer uma mudança de temperatura na amostra e na fibra, de T_0 para T , o coeficiente de partição muda de acordo com a equação:

$$K_{fs} = K_0 \exp \frac{-\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \quad (3)$$

onde K_0 é coeficiente de partição na temperatura T_0 (em Kelvin), ΔH é a mudança molar na entalpia do analito quando este se move da matriz para a fibra e R é a constante dos gases. É possível perceber, por esta equação, que o aumento de temperatura diminui o coeficiente de partição, ou seja, há uma diminuição da quantidade extraída.

Por outro lado, o aumento de temperatura causa um aumento do coeficiente de difusão, sendo necessário um tempo menor para se atingir o equilíbrio. O aumento da temperatura diminui a viscosidade do meio aumentando a difusão dos analitos [7,12]. Este efeito é mais importante quando análises são realizadas em plasma do que em água ou urina, devido à maior viscosidade daquela matriz [10].

1.2.4.4 Força iônica

A adição de um sal pode aumentar a quantidade de analito extraída, sendo o cloreto de sódio (NaCl) frequentemente usado com este propósito. É comum se perceber um aumento da extração quando se aumenta a concentração de sal, obtendo-se um máximo, seguido por uma diminuição da quantidade extraída com o aumento adicional da concentração de sal. Este

comportamento pode ser explicado considerando a ocorrência simultânea de dois processos. Inicialmente, a extração é aumentada por causa do efeito denominado “salting out”, onde moléculas de água formam esferas de hidratação ao redor das moléculas iônicas do sal. Essas esferas de hidratação reduzem a concentração de água disponível para dissolver as moléculas do analito, facilitando sua extração pela fibra. Em competição com este processo, entretanto, está o fato de que moléculas polares podem participar de interações eletrostáticas com os íons do sal em solução, reduzindo sua habilidade de se mover em direção à fibra. Assim, inicialmente predomina o efeito da interação das moléculas de sal com a água, aumentando a extração, e à medida que a concentração de sal aumenta suas moléculas começam a interagir com as moléculas do analito, dificultando a extração [12]. Dessa forma, é importante que o efeito da concentração de sal, para uma dada extração, seja avaliado experimentalmente pois pode variar entre diferentes compostos [7]. Além disso, deve-se observar que uma grande quantidade de sal na amostra pode se depositar na fibra, diminuindo a eficiência de extração ao longo do tempo [10].

1.2.4.5 pH

O pH influencia o coeficiente de partição de espécies dissociáveis, assumindo que apenas as espécies não-dissociadas de um ácido ou de uma base podem ser extraídas pelas fibras do tipo absorptivas (PDMS ou PA), de acordo com a equação:

$$K = K_0 \frac{[H^+]}{K_a + [H^+]} \quad (4)$$

onde K_o é o coeficiente de partição da forma não dissociada entre a amostra e a fibra e K_a é a constante de dissociação. Para compostos ácidos, uma diminuição do pH resultará em mais espécies na forma neutra, resultando em maior extração. Para obter maior sensibilidade, o pH deve estar duas unidades abaixo do pK_a correspondente do ácido.

Os analitos que sofreram partição dentro da fibra não participam mais do equilíbrio entre as formas ácida e básica no meio de extração aquoso. Nos casos onde o pH é controlado com um tampão, à medida que as formas não dissociadas são extraídas pela fibra, mais moléculas dissociadas se reassociam se tornando disponíveis para a extração. Dessa forma, em um meio tamponado a extração é maior do que em um meio não tamponado, onde a razão das formas dissociada e não dissociada pode variar [12].

Deve-se salientar que valores extremos de pH (menores que 2 e maiores que 10) podem danificar o recobrimento, no caso de imersão direta da fibra. O pH da amostra deve ser ajustado após adição de sal ou antes da adição de um aditivo orgânico, se for o caso [10].

1.2.4.6 Agitação da amostra

Uma técnica efetiva de agitação determina o tempo para se atingir o equilíbrio em amostras aquosas. As técnicas de agitação mais empregadas em SPME são: agitação magnética, a qual requer uma barra de agitação no interior do *vial*; vórtex, onde o *vial* é submetido a movimentos circulares; movimento da fibra; fluxo constante e ultra-som. A agitação magnética é a mais utilizada por causa da sua disponibilidade em laboratórios analíticos, e porque pode ser utilizada nos diferentes modos de SPME. O ultra-som é a técnica mais eficiente em SPME, gerando tempos de extração muito curtos. No entanto, apresenta os inconvenientes de aquecer a amostra e, em alguns casos, destruir os analitos.

Se a agitação da amostra fosse perfeita, todos os analitos presentes na matriz teriam acesso ao filme extrator, e a extração seria rápida. No entanto, na prática, independente da velocidade de agitação, o fluido em contato com a superfície da fibra é estacionário, dificultando o acesso dos analitos à fibra e, conseqüentemente, afetando o tempo de extração [3,7,11].

1.2.5 Dessorção dos analitos

Na dessorção, os analitos deixam a fase extratora, indo para o fluido de arraste, geralmente um gás em GC ou a fase móvel em HPLC. É o processo reverso ao da extração. Com o aumento da temperatura, o coeficiente de partição do analito entre a fibra e a amostra diminui. Em GC, a temperatura do injetor é elevada e os analitos são, rapidamente, removidos da fibra. Em HPLC, dois modos têm sido utilizados para a dessorção dos analitos. No modo denominado *off-line* a fibra, contendo o analito, é deixada em contato com o fluido de dessorção em um *vial*, sendo uma fração desta solução posteriormente injetada no cromatógrafo. No modo denominado *on-line*, utiliza-se uma interface que permite o acoplamento do processo de dessorção com o cromatógrafo. A Supelco introduziu no mercado uma interface para HPLC que, no entanto, apresentou alguns problemas, como vazamento, alargamento das bandas cromatográficas e ausência de reprodutibilidade. Uma nova interface, contendo um sistema de aquecimento foi desenvolvida pelo Laboratório de Cromatografia da USP de São Carlos para contornar estes problemas (Figuras 1.6-1.10) [13].

Figura 1.6. Esquema bidimensional da interface SPME-LC com aquecimento e esquema tridimensional da interface (corte transversal da câmara de dessorção).

Figura 1.7. Fotografia da interface SPME-LC sem o sistema de aquecimento desenvolvida no Laboratório de Cromatografia da USP de São Carlos.

Bloco de aquecimento

Figura 1.8. Fotografia da interface SPME-LC com o sistema de aquecimento desenvolvida no Laboratório de Cromatografia da USP de São Carlos.

Câmara de dessorção

Figura 1.9. Fotografia da interface SPME-LC com o sistema de aquecimento e detalhe da câmara de dessorção.

Figura 1.10. Interface SPME-LC com sistema de aquecimento ligada ao sistema cromatográfico.

Esta nova interface consiste de uma válvula Valco (Houston, EUA) de seis pórticos conectada a uma câmara de dessorção *homemade* com volume interno de 60 μL , a qual está inserida em um bloco de aquecimento construído em alumínio. Aquecimento contínuo é obtido por meio de um cilindro resistivo de 25 W de potência (9,4 mm de diâmetro e 39 mm de comprimento) adquirido da Casa Ferreira (São Paulo, Brasil). A temperatura da câmara de dessorção e do bloco de aquecimento é monitorada com um termopar tipo PT 100 e controlado por meio de um controlador de temperatura, microprocessado, modelo MDH002N-220VCA-PO17, ligado a um relê de estado sólido, modelo RSR, fabricados por Tholtz Sistemas Eletrônicos (Rio Grande do Sul, Brasil).

A Figura 1.11 demonstra um desenho esquemático da câmara de dessorção da interface, a qual possui um volume de 60 μL . É nesta câmara que a fibra é exposta, entrando em contato com a fase móvel (ou outro solvente), ocorrendo o processo de dessorção.

Figura 1.11. Desenho em três dimensões do corpo da câmara de dessorção [13].

A dessorção utilizando a interface pode ocorrer de duas maneiras: estática ou dinâmica. Na estática, a câmara da interface é preenchida com a fase móvel e a fibra é exposta por um determinado tempo. Ao final deste tempo a fibra é recolhida e a válvula é colocada numa posição, a qual permite que a fase móvel passe pela câmara levando todo o analito dessorvido. Na dinâmica, diferentemente, a fibra é exposta na câmara e a válvula é colocada na posição que permite a passagem da fase móvel de maneira contínua, permitindo uma dessorção mais efetiva dos analitos. A Figura 1.12 demonstra um esquema da interface com dessorção no modo estático, com a válvula nas posições de dessorção e de injeção da amostra.

Figura 1.12. Esquema da interface SPME demonstrando o modo de dessorção estático, com a válvula nas posições de dessorção (esquerda) e de injeção da amostra (direita) [13].

1.3 FLUOXETINA

1.3.1 Farmacodinâmica e farmacocinética

Os fármacos antidepressivos podem ser classificados em três diferentes classes: os tricíclicos, os inibidores da monoamino oxidase e os inibidores seletivos de recaptação da serotonina. Os dois primeiros grupos foram descobertos quase que simultaneamente, na segunda metade da década de 1950, e atuam elevando o nível cerebral das monoaminas noradrenalina e serotonina [14].

O terceiro grupo, os inibidores seletivos de recaptação da serotonina, foi racionalmente desenvolvido na década de 1970, como medicamentos psicotrópicos. Estes fármacos iniciaram uma nova era no desenvolvimento de drogas utilizadas no tratamento de transtornos psiquiátricos [15,16].

A fluoxetina (Figura 1.13a) é um fármaco pertencente à classe dos inibidores seletivos de recaptação da serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT). Apareceu pela primeira vez na literatura científica em 1974 e, em 1987 teve seu uso, como antidepressivo, aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA), órgão de controle de medicamentos do governo dos Estados Unidos. Desde então, é a droga antidepressiva mais prescrita em todo o mundo. Posteriormente, teve seu uso aprovado para o tratamento da desordem obsessiva-compulsiva e da bulimia. Atualmente, além destas indicações, tem sido utilizada no combate à ansiedade, às desordens de alimentação, à fobia social e à doença do pânico [15,16].

A fluoxetina, (D,L-*N*-metil-3-fenil-3-[(α,α,α -trifluoro-*p*-tolil)oxi]propilamina), é uma mistura racêmica de dois enantiômeros, onde o S-enantiômero é aproximadamente 1,5 vezes mais potente que o R-enantiômero em inibir a recaptação de serotonina. Essa diferença de potência farmacológica é ainda mais marcante para o metabólito ativo norfluoxetina, onde o

S-enantiômero tem uma capacidade inibidora cerca de 20 vezes mais potente do que o R-enantiômero [17].

Após a administração oral, a fluoxetina é quase completamente absorvida e possui alta ligação às proteínas plasmáticas. É extensivamente metabolizada no fígado por N-desmetilação, levando à formação, principalmente, do metabólito ativo norfluoxetina (Figura 1.13b), o qual, em seguida, é convertido em outros metabólitos conjugados que serão eliminados na urina [17,18]. Norfluoxetina tem a mesma atividade farmacológica que a fluoxetina, havendo uma boa correlação entre a concentração sanguínea destes dois compostos [18]. A dose utilizada para o tratamento da depressão é de 20 mg por dia [16,19]. As concentrações de fluoxetina e norfluoxetina encontradas no plasma de pacientes (homens ou mulheres), em um estudo em que receberam esta dose, foram de cerca de 80 ng mL⁻¹ e 70 ng mL⁻¹, respectivamente [20]. Em outro estudo, realizado com indivíduos com idade na faixa de 65 a 85 anos, as concentrações médias no plasma de fluoxetina e norfluoxetina foram de 303 ng mL⁻¹ e 231 ng mL⁻¹, respectivamente [21].

Figura 1.13. Estruturas químicas da (a) fluoxetina, (b) norfluoxetina e (c) clomipramina.

1.3.2 Análise em fluidos biológicos

Diferentes métodos têm sido desenvolvidos para a análise de fluoxetina em fluidos biológicos, principalmente utilizando HPLC, com detector de ultravioleta ou de fluorescência. A extração do fármaco do sangue ou do fluido cerebral tem sido realizada utilizando, principalmente, as técnicas de extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE). No entanto, estas técnicas apresentam o inconveniente de serem tediosas, além de demandarem muito tempo e grande quantidade de solventes, geralmente tóxicos e caros, para sua utilização.

RAGGI *et al.* desenvolveram um método para análise de fluoxetina e norfluoxetina em plasma, por HPLC com detecção por fluorescência, utilizando SPE para o tratamento das amostras. O limite de quantificação obtido foi de $8,0 \text{ ng mL}^{-1}$ [22]. Posteriormente, os mesmos autores desenvolveram nova metodologia utilizando LLE para o tratamento das amostras, o que permitiu o aumento da sensibilidade. O limite de quantificação encontrado foi de $2,5 \text{ ng mL}^{-1}$ [23].

CLAUSING *et al.* determinaram três fármacos, D-fenfluramina, D-norfenfluramina e fluoxetina, em plasma e tecido cerebral, utilizando HPLC com detecção por fluorescência, após derivatização com cloreto de dansila. Foi realizada LLE para o tratamento das amostras [24].

Outro método foi desenvolvido para análise de fluoxetina, citalopram, paroxetina e seus metabólitos em plasma. A análise foi realizada por HPLC, com detecção no ultravioleta, e extração por SPE [25].

ALVAREZ *et al.* desenvolveram método para análise de fluoxetina e norfluoxetina no sangue e em áreas cerebrais utilizando HPLC com detecção por ultravioleta. O método desenvolvido utilizava LLE e permitia a utilização de pequenos volumes de amostra ($100 \mu\text{L}$). O limite de detecção obtido foi de $5,0 \text{ ng mL}^{-1}$ [26].

MAYA *et al.* analisaram a fluoxetina em plasma utilizando HPLC com detecção no ultravioleta. O fármaco foi isolado do plasma utilizando LLE e o limite de quantificação obtido foi de $5,0 \text{ ng mL}^{-1}$ [27].

Foram encontrados na literatura alguns estudos empregando *column-switching*, um sistema rápido e moderno, para a determinação de fluoxetina. No entanto, esta técnica requer uma instrumentação mais cara e complexa para ser utilizada [28,29].

Até o momento, apenas dois estudos empregando SPME para a determinação de fluoxetina foram encontrados na literatura. No entanto, nestes trabalhos a determinação foi realizada utilizando cromatografia gasosa e derivatização, uma etapa adicional [30, 31].

A determinação de fluoxetina em fluidos biológicos tem importância fundamental em estudos farmacocinéticos, na comparação do comportamento de diferentes formulações, em estudos de bioequivalência e na monitorização terapêutica de fármacos.

1.4 PREPARO DE COLUNAS PARA HPLC

Atualmente, há uma enorme variedade de colunas comercialmente disponíveis para HPLC. Porém, esse fato não impede que colunas com desempenho similar, ou até superior, ao das comerciais sejam conseguidos com colunas empacotadas no próprio laboratório (*homemade*). Existem diferentes técnicas utilizadas para o empacotamento de colunas para HPLC, cada qual com suas vantagens, desvantagens e limitações. Encontram-se na literatura trabalhos utilizando empacotamento por *slurry*, compressão radial dinâmica, compressão axial dinâmica e fluido supercrítico [32-34].

No empacotamento por *slurry* uma suspensão da fase estacionária (utilizando solvente que molhe e disperse bem) é empurrada através da coluna, no topo da qual existe um *frit* para impedir a saída do material de empacotamento. O solvente é pressionado em um fluxo

elevado e sob uma pressão de, aproximadamente, 800 atm. A consolidação da fase estacionária é alcançada empurrando-se o solvente por cerca de 30 minutos.

O empacotamento por compressão axial, por sua vez, consiste de uma espécie de seringa, cujo êmbolo pressuriza uma suspensão espessa do material de empacotamento para o interior do tubo.

O empacotamento por compressão radial consiste de um tubo que desliza internamente ao tubo da coluna cromatográfica e que dispensa, sob pressão, o material de empacotamento em sentido radial.

O empacotamento por fluido supercrítico utiliza CO₂ no estado supercrítico para carregar o material de empacotamento para o interior do tubo [32,35].

Geralmente, o empacotamento por *slurry* é o mais utilizado para empacotamento de colunas convencionais de HPLC. Empacotamentos por compressão radial e axial são mais aplicados na construção de colunas para HPLC preparativa, embora possam ser utilizadas para empacotar colunas analíticas. Normalmente, o empacotamento por fluido supercrítico aplica-se à construção de colunas de diâmetro interno menor que 1 mm, devido à limitação da pressurização de grandes volumes de CO₂.

1.5 PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS

Otimização corresponde a tornar algo tão perfeito, efetivo ou funcional quanto possível. Portanto, pode-se definir otimização como sendo um processo baseado em instruções que permitam obter o melhor resultado de uma dada situação. Cientificamente, estas instruções são frequentemente expressas através de métodos matemáticos que procuram maximizar alguma propriedade específica do sistema em estudo. É na escolha desta propriedade a ser otimizada, e das condições de controle, que se encontra grande parte das

discussões sobre qual a melhor indicação para um desempenho ideal do sistema. Em diversas circunstâncias, esta propriedade a ser otimizada é denominada função objetivo ou resposta. A otimização divide-se em estágios que se caracterizam por:

- definição da função objetivo (resposta). Podem ser um ou mais critérios a serem observados;
- determinação dos fatores (variáveis) que apresentam influências significativas sobre a resposta que se deseja otimizar;
- otimização propriamente dita, isto é, procurar a combinação dos valores dos fatores selecionados que resultem na melhor resposta (maximização ou minimização).

Diferentes métodos podem ser utilizados visando-se a otimização de um sistema, tais como: univariado, simplex e planejamento fatorial [36].

1.5.1 Método univariado

Este método de otimização é classificado como um método sequencial, e é também conhecido como método clássico de pesquisa, método do fator único ou estratégia um-fator-de-cada-vez. Neste método, fixam-se todos os fatores que estão sendo pesquisados em certo nível, menos um deles. Este último é, então, variado até que se encontre a melhor resposta, passando então esta condição a ser fixada, e um novo fator sofre variação. O processo se repete até que todos os fatores tenham sido adequados para fornecer a melhor resposta.

Este tipo de procedimento é, provavelmente, o método de otimização mais comum em química, porém não garante que a região ótima seja localizada. O ótimo não será alcançado se a superfície de resposta contiver cristas e, neste caso, o método falha e um falso ótimo é

encontrado. Este erro é comum nos sistemas químicos onde, além da interdependência de fatores, a localização do ótimo real pelo método univariado depende dos valores iniciais escolhidos para as variáveis a serem otimizadas. Deve-se salientar, também, que quanto maior a interação entre as variáveis, maior será a probabilidade de localização de um falso ótimo. Portanto, o método univariado é muito bom para sistemas onde as variáveis otimizadas são independentes, o que é relativamente raro para sistemas químicos [36].

1.5.2 Método simplex

O método simplex é um método seqüencial de otimização e pode ser empregado, assim como o método univariado, tanto para maximizar como para minimizar resultados.

Um simplex é uma figura geométrica em n dimensões, constituído de $n+1$ pontos. Cada dimensão corresponde a uma variável a ser otimizada. Um simplex de duas dimensões é um triângulo, em três dimensões é um tetraedro e assim sucessivamente. Pode ser aplicado, teoricamente, para a otimização de qualquer número de variáveis.

O método simplex é dividido em três tipos distintos: básico, modificado e supermodificado [36].

1.5.2.1 Simplex Básico

O procedimento de otimização no método simplex começa pela escolha dos $n+1$ pontos onde será feita a avaliação da resposta. Na Figura 1.14 é exemplificado o processo, para o qual a otimização começa com os pontos A, B e C. Estes pontos formam um triângulo e, por meio da análise da figura, verifica-se que o ponto A apresenta a pior resposta dos três. Uma conclusão lógica é que a melhor resposta está na direção oposta a este ponto. Portanto, o

simplex é refletido de modo que o ponto D, oposto ao ponto A, seja obtido. Um experimento seguinte é então efetuado nas condições experimentais do ponto D. Os pontos B, C e D juntos formam um novo simplex. O procedimento é repetido sucessivamente, descartando-se a pior resposta. Desta forma, pode-se perceber que o objetivo deste método é forçar o simplex a mover-se para a região da resposta ótima. Várias regras são utilizadas para orientar como são efetuados estes movimentos do simplex [36].

Figura 1.14. Progresso de um simplex bidimensional em direção ao ótimo.

Na fase inicial dos experimentos, é aconselhável construir um simplex grande para que o mesmo se mova rapidamente sobre a superfície de respostas e possa localizar a região de ótimo. Para definir mais precisamente o ótimo constrói-se, então, um simplex menor e continua-se a otimização.

A despeito das vantagens deste método, algumas limitações são encontradas: o ótimo só é precisamente localizado por acaso, um falso ótimo pode ser localizado e o progresso do simplex em direção ao ótimo somente pode ser efetuado numa taxa constante.

1.5.2.2 Simplex Modificado

Este método surgiu a partir de propostas de modificações no procedimento original de movimentação do simplex básico, permitindo obter-se um ponto ótimo estacionário, com suficiente precisão e clareza, além de permitir um desenvolvimento mais rápido do simplex em direção ao ótimo. As regras de movimentação do simplex básico podem ser aplicadas também aqui, e a estas foram acrescidas outras [36]. A Figura 1.15 demonstra um exemplo de movimentação em um simplex modificado.

Figura 1.15. Movimentação do método simplex modificado.

1.5.2.3 Simplex Supermodificado

Neste método, a forma e o tamanho do simplex podem ser ajustados de acordo com as características da superfície analisada, tornando a busca pelo ótimo ainda mais eficiente. No entanto, o tratamento matemático necessário para seu desenvolvimento torna-se mais complexo, envolvendo o ajuste de equações polinomiais. Além disso, é necessário realizar-se um experimento a cada movimento do simplex [36].

1.5.3 Método do planejamento fatorial

O planejamento fatorial tem sido muito aplicado em pesquisas básicas e tecnológicas e é classificado como um método do tipo simultâneo, onde as variáveis de interesse que realmente apresentem influências significativas na resposta são avaliadas ao mesmo tempo.

Para realizar um estudo deste tipo, devem-se escolher as variáveis a serem estudadas e efetuar-se experimentos em diferentes valores (níveis) destes fatores. De um modo geral, o planejamento fatorial pode ser representado por b^{α} , onde α é o número de fatores e b é o número de níveis escolhidos. Em um estudo que tenha 3 fatores e 2 níveis (2^3), o número total de experimentos é 8.

Nos planejamentos experimentais onde as variáveis são exploradas em 2 níveis, é comum codificá-los usando os sinais (+) e (-). A atribuição destes sinais aos níveis superiores ou inferiores é feita de forma arbitrária e não interfere na realização dos experimentos ou interpretação dos resultados, além de permitir esquematizar o planejamento na forma de matrizes de planejamento [36]. A Tabela 1.2 exemplifica a organização dos dados em uma matriz de planejamento.

Os efeitos obtidos em cada um dos experimentos avaliados são, posteriormente, utilizados para gerar informações a respeito das tendências de cada fator estudado (no exemplo acima, temperatura, concentração e catalisador). Os efeitos são definidos como “a mudança ocorrida na resposta quando se move do nível baixo (-) para o nível alto (+)” e podem ser de dois tipos: principais e de interação.

Tabela 1.2. Matriz de planejamento [36].

Variáveis	Nível baixo	Nível alto
Temperatura (T) °C	160 (-)	180 (+)
Concentração (C) %	20 (-)	40 (+)
Catalisador (K)	A (-)	B (+)

Experimento	T	C	K
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

O efeito principal é aquele causado no sistema químico, por uma das variáveis, quando seus níveis passam de um valor para outro. Já o efeito de interação é aquele causado no sistema em estudo pela interação de variáveis, podendo ser de segunda, terceira ou de ordem superior, de acordo com o número de fatores considerados na otimização.

No método de planejamento fatorial o número de experimentos pode ser muito elevado, mesmo tratando-se de fatorial de dois níveis, pois isto depende do número de variáveis avaliadas. Entretanto, de maneira geral, as interações de ordem alta (terceira, quarta ou superiores) são pequenas, e podem ser confundidas com o desvio padrão dos efeitos. Assim, é possível executar um planejamento fatorial parcial (fracionado) sem que seja necessária a determinação de todos os parâmetros de interação. Neste caso pode-se diminuir o número de experimentos e ainda determinar os efeitos mais importantes (principais e de interações de segunda ordem) [36].

1.5.4 Método de análise de superfície de resposta

Este método é classificado como um método simultâneo, sendo utilizado na etapa de otimização propriamente dita. Sua aplicação permite selecionar a combinação de níveis ótimos na obtenção da melhor resposta para uma dada situação.

Neste método são realizados planejamentos fatoriais para cujos resultados são ajustados modelos matemáticos. Estas etapas, conhecidas como etapa de deslocamento e modelamento, são repetidas várias vezes, mapeando a superfície de respostas obtida na direção da região do ponto de ótimo desejado. A modelagem normalmente é feita ajustando-se os modelos mais simples, como o linear e o quadrático. Por sua vez, o planejamento fatorial executado permite, geralmente, constituir-se de um número pequeno e pré-determinado de experimentos, os quais são determinados através do ajuste conseguido para o modelo que foi aplicado na etapa imediatamente anterior. Usualmente, a modelagem é iniciada utilizando-se o modelo linear. Para tal, realiza-se um planejamento fatorial de primeira ordem [36].

2 OBJETIVOS

- Desenvolver e otimizar um método para a análise de fluoxetina e norfluoxetina por HPLC com detecção UV-Visível.
- Empacotar colunas C18 pelo sistema *slurry packing* para análise de fluoxetina e norfluoxetina.
- Otimizar as condições de extração por SPME empregando dois tipos diferentes de fibras: PDMS-DVB e CW-TPR.

- Avaliar a interface para acoplamento SPME-LC desenvolvida no Laboratório de Cromatografia.
- Avaliar o efeito da temperatura na dessorção *on-line* da fluoxetina e norfluoxetina.
- Validar o método para a determinação de fluoxetina e norfluoxetina em plasma por SPME-LC *on-line* utilizando interface *homemade* com sistema de aquecimento.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 PADRÕES E REAGENTES

Os padrões de clomipramina (CLO, Figura 1.13c), fluoxetina (FLU) e norfluoxetina (nor-FLU) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Os padrões de naftaleno, antraceno e pireno foram obtidos da Supelco (Bellefonte, EUA), de bifenila foi obtido da Eastman (Kingsport, EUA) e de uracila foi obtido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

Foram usados, ainda, acetato de amônio, ácido acético, metanol e acetonitrila Mallinckrodt (Paris, EUA), tetraborato de sódio Reagen (Rio de Janeiro, Brasil), ácido clorídrico e trietilamina J. T. Baker (Xalostoc, México), e cloreto de sódio Grupo Química (Rio de Janeiro, Brasil). Todos os solventes e reagentes usados possuíam grau HPLC ou analítico. A água utilizada para preparar todas as amostras e soluções foi purificada em um sistema Milli-Q Ultra Pure Water System Miilipore (Bedford, EUA).

Amostras de plasma branco foram gentilmente cedidos pelo Hospital Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Carlos (São Carlos, SP, Brasil), sendo mantidas congeladas em freezer a -20 °C. Utilizou-se, para o empacotamento das colunas, octadecilsilano (C18), 3 µm, *pH stable* Phase Sep (Norwalk, EUA).

3.2 MATERIAIS

- Holder manual para fibras SPME Supelco (Bellefonte, EUA).
- Fibras para SPME PDMS-DVB 60 µm e CW-TPR 50 µm Supelco (Bellefonte, EUA).
- Membranas para filtração hidrofílicas 0,45 µm.
- Frasco transparente para SPME com tampa de rosca e septo de teflon/silicone de 5 mL Supelco (Bellefonte, EUA).
- Barra de agitação magnética triangular para extração em SPME.
- Interface SPME-LC projetada e construída no Laboratório de Cromatografia (CROMA).

3.3 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica Mettler Toledo (modelo AG285)
- Potenciômetro Micronal (modelo B-374)
- Agitador magnético VWR Scientific Products
- Banho termostatzado Quimis
- Bomba de amplificação pneumática Haskel (Burbank, EUA)
- Cromatógrafo líquido Shimadzu (Kioto, Japão) (série LC-10A), equipado com duas bombas (modelo LC-10Ai), forno para coluna (modelo CTO-10ASVP), detector UV-Visível de comprimento de onda fixo (SPD-10AVP), amostrador automático (modelo SIL-10Ai), controlador de sistema (modelo SCL-10AVP), desgaseificador (modelo DGU14A) e software de aquisição de dados Class-VP
- Cromatógrafo líquido Shimadzu (Kioto, Japão) (série LC-10A), equipado com duas bombas (modelo LC-10Ai), forno para coluna (modelo CTO-10ACVP), detector de arranjo de fotodiodos (SPD-M10AVP), controlador de sistema (modelo SCL-10AVP), desgaseificador (modelo DGU2A) e software de aquisição de dados Class-VP

3.4 MÉTODOS

3.4.1 Empacotamento de colunas C18

A FLU e a CLO são compostos com características básicas, tendo pKa's de 8,7 e 9,3, respectivamente. Devido a esta característica, tendem a apresentar “cauda” em análises realizadas em colunas de fase reversa convencionais, devido às interações com os grupos silanóis da sílica. Para contornar este problema foi empacotada coluna utilizando sílica C18, 3 μm *pH stable* Phase Sep, própria para a análise de compostos básicos. Utilizou-se o método *slurry packing* para o empacotamento da coluna. Primeiramente foi empacotada coluna com as dimensões de 150 x 4,6 mm e posteriormente empacotou-se uma coluna menor (50 x 4,6 mm) para aumentar a rapidez das análises.

Inicialmente, pesou-se uma quantidade de sílica (2,0 g) que proporcionasse uma densidade de, aproximadamente, 0,8 g mL⁻¹, considerando o volume da coluna como 2,49 mL. Em seguida, preparou-se uma suspensão da sílica em metanol. Para o empacotamento da coluna menor utilizou-se 0,66 g de sílica.

Em seguida, as colunas foram empacotadas durante 30 minutos sob uma pressão de, aproximadamente, 7300 psi, utilizando uma bomba de amplificação pneumática Haskel (Burbank, EUA) e nitrogênio industrial como gás de pressurização. Após esse período, o sistema foi despressurizado lentamente, por 15 horas.

Para verificar a presença de algum vazamento e também as pressões oferecidas pelas colunas, passou-se através da coluna uma mistura de solventes composta de acetonitrila:metanol (1:1), com fluxo de 1 mL min⁻¹ durante 30 minutos.

A fim de avaliar os parâmetros cromatográficos da coluna, foi injetada mistura teste composta de naftaleno, bifenila, antraceno e pireno em metanol e solução de uracila. Foram

calculados os parâmetros número de pratos, resolução, fator de retenção e fator de separação. Utilizou-se água:acetonitrila (30:70) como fase móvel, fluxo de 1 mL min⁻¹, temperatura de 35 °C, volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda de 254 nm.

3.4.2 Preparo dos padrões analíticos

Foram preparadas soluções estoque de FLU, nor-FLU e CLO em metanol na concentração de 1000 µg mL⁻¹, as quais foram mantidas sob refrigeração a 4 °C. Essas soluções foram diluídas para soluções de trabalho de FLU e nor-FLU a 10,0 µg mL⁻¹ e 1,0 µg mL⁻¹ e CLO a 10 µg mL⁻¹.

As amostras de plasma humano foram centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos e filtradas através de membranas de 0,45 µm. Para se obter concentrações de 25, 50, 100, 200, 300 e 500 ng mL⁻¹, alíquotas adequadas de soluções de trabalho de FLU, nor-FLU e CLO foram transferidas para *vials* de 5 mL, secadas com nitrogênio e suspensas em 1,0 mL de plasma branco.

Foi também preparada solução padrão teste para colunas C18, composta de naftaleno 10,8 µg mL⁻¹, bifenila 76 µg mL⁻¹, antraceno 11,1 µg mL⁻¹ e pireno 7,6 µg mL⁻¹ em metanol. Uma solução de uracila 100 µg mL⁻¹ foi também utilizada como marcador do tempo morto.

3.4.3 Condições cromatográficas

Inicialmente, o padrão de nor-FLU não estava disponível. Assim, foi desenvolvido método de análise para FLU e CLO por HPLC utilizando detector UV-Visível. Foram obtidos espectros da FLU e CLO no ultravioleta, para escolha do comprimento de onda ideal.

Testou-se tampão acetato de amônio $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,5:acetonitrila como fase móvel. Foram testadas diferentes proporções da fase móvel.

Em seguida, preparou-se fase móvel constituída de tampão acetato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,5:acetonitrila, também em diferentes proporções.

Posteriormente, a fase móvel foi substituída para acetonitrila:tampão acetato de amônio 25 mmol L^{-1} adicionado de trietilamina 25 mmol L^{-1} pH 4,6 (70:30). Foi utilizado fluxo de 1 mL min^{-1} , temperatura de $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$, volume de injeção de $20 \text{ }\mu\text{L}$ e comprimento de onda de 227 nm .

Foi injetada amostra de FLU e CLO nas concentrações de $25 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ e $50 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Foram avaliados parâmetros como número de pratos e resolução. Foram, também, comparadas as duas colunas empacotadas.

3.4.4 Otimização das condições de extração por SPME

As fibras novas foram condicionadas na fase móvel por 15 minutos, sob agitação, e antes de cada extração as fibras foram lavadas no mesmo solvente por 15 minutos para evitar efeito de memória.

As extrações foram realizadas em *vials* de 5 mL fechados com tampa de rosca, contendo orifício para a fibra de SPME. Barras de agitação triangulares foram usadas para agitar as amostras durante a extração. Um mililitro de plasma fortificado e $4,0 \text{ mL}$ de tampão borato 50 mmol L^{-1} foram usados em todas as análises com uma velocidade de agitação de 1100 rpm . Após a extração as fibras foram introduzidas em *vial* de $200 \text{ }\mu\text{L}$ para dessorção *off-line* ou na câmara de dessorção da interface para dessorção *on-line* por 15 minutos.

Foi empregado planejamento fatorial fracionado (2^{4-1}) com o objetivo de otimizar a extração com os dois tipos de fibras disponíveis (PDMS-DVB e CW-TPR), variando-se as

condições de tempo (25 e 50 minutos), temperatura (30 °C e 50 °C), concentração de sal (0 e 10% de NaCl) e pH (9,0 e 11,0). A otimização destes parâmetros foi feita utilizando-se dessorção no modo *off-line*. O software Statistica 6.0 foi utilizado para construção do modelo e este foi avaliado por ANOVA. A Tabela 1.3 demonstra o esquema de planejamento realizado.

Tabela 1.3. Planejamento fatorial fracionado (2^{4-1}) usado para otimizar as condições de extração em SPME.

Variáveis	Nível baixo	Nível alto
Tempo (minutos)	25 (-)	50 (+)
Temperatura (°C)	30 (-)	50 (+)
Força iônica (%NaCl)	0 (-)	10 (+)
pH	9,0 (-)	11,0 (+)

Experimento	Tempo	Temperatura	Força iônica	pH
1	-	-	-	-
2	-	-	+	+
3	-	+	-	+
4	+	-	-	+
5	-	+	+	-
6	+	+	-	-
7	+	-	+	-
8	+	+	+	+

Após a otimização foi construída uma curva para avaliar a cinética de extração da FLU nos tempos de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 minutos, a fim de avaliar-se o tempo necessário para que o equilíbrio seja atingido.

Foi realizada dessorção nos modos *off-line* e *on-line*, com e sem temperatura elevada, para avaliar a eficiência da interface. Diferentes temperaturas (25, 40, 50, 60, 70 e 80 °C) foram utilizadas para avaliar o seu efeito sobre o processo de dessorção.

3.4.5 Validação

A especificidade do método foi avaliada por meio da análise de seis amostras diferentes de plasma branco. Foi avaliada a presença de interferentes eluindo no mesmo tempo de retenção da FLU, nor-FLU ou CLO.

A linearidade foi verificada analisando-se amostras de plasma fortificadas nas concentrações de 25, 50, 100, 200, 300 e 500 ng mL⁻¹, com três replicatas em cada ponto e utilizando CLO na concentração de 1000 ng mL⁻¹ como padrão interno. O coeficiente de correlação (R^2) e a equação linear de regressão foram calculados pelo método dos mínimos quadrados.

A precisão intra-dia ($n = 5$) foi avaliada nas concentrações de 25, 100 e 500 ng mL⁻¹. A precisão inter-dias ($n = 3$) foi verificada nas mesmas concentrações por meio de análises realizadas em dois dias diferentes. A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR%).

O limite de quantificação (LOQ) foi determinado analisando-se amostras de FLU e nor-FLU na concentração de 25 ng mL⁻¹, empregando-se cinco replicatas, e verificando-se o DPR%, o qual deveria ser menor que 20,0%. O limite de detecção foi considerado como a menor concentração onde o pico do analito fosse duas vezes maior que o ruído da linha de base.

A recuperação foi determinada por meio de análises do padrão analítico de FLU e nor-FLU nas concentrações de 25, 100 e 500 ng mL⁻¹ ($n = 3$) utilizando o volume de injeção de 60 µL, o mesmo volume injetado na dessorção por SPME. Os valores obtidos foram comparados com aqueles obtidos no cálculo da linearidade, sendo a recuperação expressa como porcentagem da quantidade extraída.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EMPACOTAMENTO DE COLUNAS C18

A queda de pressão (diferença de pressão entre a entrada e a saída da coluna) oferecida pela coluna de 150 mm, quando uma fase móvel constituída de acetonitrila:metanol (1:1) foi eluída através dela, foi de cerca de 50 bar, valor típico para colunas desta dimensão, demonstrando ter sido satisfatório o empacotamento. Também não foi observado vazamento em nenhuma das duas colunas.

A Figura 1.16 apresenta o cromatograma da mistura teste obtido com a coluna C18 150 x 4,6 mm, 3 μ m. Os valores do fator de retenção para os compostos 1 e 2 foram 1,57 e 2,13, respectivamente, e o fator de separação entre estes dois picos foi de 1,3; valor adequado para uma boa separação. O número de pratos para os picos 2 e 4 foi, respectivamente, 3600 e 5476, valores adequados para colunas desta dimensão. A resolução entre os picos 1 e 2 foi de 2,9, bem superior ao valor mínimo considerado ideal, que é 2.

Figura 1.16. Cromatograma da mistura teste obtido com coluna C18 150 x 4,6 mm, 3 μ m; fase móvel constituída de acetonitrila:água (70:30), fluxo de 1 mL min⁻¹, temperatura de 35 °C e volume de injeção de 20 μ L. (1) naftaleno; (2) bifenila; (3) antraceno; (4) pireno.

A Figura 1.17 ilustra um cromatograma típico obtido utilizando a coluna de 50 x 4,6 mm. O número de pratos obtido para os picos 2 e 4 são, respectivamente, 400 e 484. A resolução entre os picos 1 e 2 foi de 1,4, que não pode ser considerado ideal, mas permite uma boa separação. O fator de separação entre os picos 1 e 2 foi de 1,4.

Figura 1.17. Cromatograma da mistura teste obtido com coluna C18 50 x 4,6 mm, 3 μ m; fase móvel constituída de acetonitrila:água (50:50), fluxo de 1 mL min⁻¹, temperatura de 35 °C e volume de injeção de 20 μ L. (1) Naftaleno; (2) bifenila; (3) antraceno; (4) pireno.

4.2 ANÁLISE DE FLU E NOR-FLU POR HPLC-UV

As Figuras 1.18 e 1.19 demonstram os espectros no ultravioleta da FLU e CLO. O comprimento de onda onde há um máximo de absorção para FLU está em torno de 227 nm. Neste comprimento de onda a CLO também apresenta boa absorção.

As fases móveis constituídas de tampão acetato de amônio 0,25 mol L⁻¹ e 0,1 mol L⁻¹ não deram bons resultados pois, apesar da FLU apresentar picos simétricos e com tempo de retenção curto, a CLO eluída da coluna em um tempo grande para nossos propósitos (cerca de 15 minutos), além de apresentar “cauda” acentuada. Este resultado sugere que a alta

concentração de íons amônio presentes no tampão não foi eficiente em neutralizar a ação dos grupos silanóis sobre a CLO.

Figura 1.18. Espectro da FLU no ultravioleta.

Figura 1.19. Espectro da CLO no ultravioleta.

A fase móvel composta de acetonitrila:tampão acetato de amônio 25 mmol L^{-1} adicionado de trietilamina 25 mmol L^{-1} pH 4,6 (70:30) forneceu bons resultados, indicando ser a trietilamina muito eficiente na neutralização dos grupos silanóis. Foram obtidos picos simétricos, e com tempo de retenção pequeno.

A Figura 1.20 apresenta o cromatograma obtido com a coluna C18 (150 x 4,6, $3 \mu\text{m}$) para a mistura de FLU e CLO, nas condições otimizadas em HPLC. O número de pratos para

a FLU e CLO foram, respectivamente, 5625 e 4741, valores elevados para colunas deste diâmetro e comprimento. A resolução entre os dois picos foi de 8,2, valor muito acima do necessário para obter-se uma boa separação, considerando 2 como valor ideal.

Figura 1.20. Cromatograma da mistura FLU ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) e CLO ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) obtido com coluna C18 (150 x 4,6 mm, 3 μm); fase móvel constituída de acetonitrila:tampão acetato de amônio 25 mmol L^{-1} adicionado de trietilamina 25 mmol L^{-1} pH 4,6 (70:30), fluxo de 1 mL min^{-1} , temperatura de 35 $^{\circ}\text{C}$, volume de injeção de 20 μL , 227 nm.

Na Figura 1.21 pode-se visualizar um cromatograma obtido com a coluna de 50 x 4,6 mm. O número de pratos teóricos obtido para a FLU e CLO foi de 507 e 610, respectivamente. A resolução foi de 2,8, valor ótimo para uma boa separação. Com esta coluna de comprimento reduzido foi possível realizar a corrida cromatográfica em tempo muito curto (aproximadamente 2 minutos). Apesar do bom resultado obtido com esta coluna optou-se por utilizar a coluna com comprimento maior (15 cm) para o desenvolvimento do método pois permitiu uma separação de picos melhor, além dos picos eluírem com um tempo de retenção um pouco maior, permitindo uma melhor separação dos compostos endógenos do plasma, que geralmente eluem nos minutos iniciais da análise.

Figura 1.21. Cromatograma da mistura FLU ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e CLO ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) obtido com coluna C18 ($50 \times 4,6 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$); fase móvel constituída de acetonitrila:tampão acetato de amônio 25 mmol L^{-1} adicionado de trietilamina 25 mmol L^{-1} pH 4,6 (70:30), fluxo de 1 mL min^{-1} , temperatura de 35°C , volume de injeção de $20 \mu\text{L}$, 227 nm .

Posteriormente, foram realizadas análises adicionando-se a nor-FLU. As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas utilizadas anteriormente e se mostraram adequadas para a análise de FLU e nor-FLU em amostras de plasma. Os picos se mostraram simétricos, com adequada resolução e reduzido tempo de análise (9,0 minutos). Os tempos de retenção da nor-FLU, FLU e CLO foram, respectivamente, 3,8; 4,6 e 7,9 minutos (Figura 1.22).

Figura 1.22. Cromatograma de plasma fortificado (FLU e nor-FLU a 200 ng mL^{-1} e CLO a 1000 ng mL^{-1}) obtido após extração por SPME nas seguintes condições: fibra PDMS-DVB, 30 minutos, 50°C , sem sal, pH 9,0 e dessorção *on-line* (60°C).

4.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR SPME

A Figura 1.23 apresenta um digrama de Pareto onde pode-se visualizar a importância de cada parâmetro estudado, bem como suas interações. Como pode ser observado, o uso de NaCl tem um efeito negativo sobre a extração, diminuindo a quantidade de FLU extraída. Assim, essa variável foi retirada e quatro novos experimentos foram realizados, produzindo um planejamento fatorial completo (2^3).

Figura 1.23. Diagrama de Pareto mostrando os efeitos dos parâmetros avaliados para a fibra PDMS-DVB.

A Figura 1.24 ilustra um cubo de respostas onde os valores de área obtidos no planejamento fatorial completo estão demonstrados.

Figura 1.24. Cubo de resposta com valores de área para cada experimento do planejamento fatorial completo para a fibra PDMS-DVB.

A Figura 1.25 demonstra o diagrama de Pareto do planejamento fatorial completo. A porcentagem de variação explicada pelo modelo 2^3 foi maior que 99,7, permitindo uma adequada avaliação dos efeitos de cada parâmetro. A linha pontilhada indica a região acima da qual os efeitos foram significativos (com limite de confiança de 95%).

Figura 1.25. Diagrama de Pareto do planejamento fatorial completo (2^3) para a fibra PDMS-DVB.

O parâmetro tempo foi aquele que apresentou maior influência na extração. O tempo atua de modo positivo, ou seja, o aumento do tempo produz aumento da quantidade extraída. Este resultado está de acordo com a literatura, pois a SPME é uma técnica baseada na partição do analito entre duas fases, sendo necessário um tempo adequado para se atingir o equilíbrio.

A temperatura também apresentou um efeito positivo na extração. A temperatura pode agir de dois modos distintos na extração: aumentando a difusão do analito e, como consequência, aumentando a extração, ou diminuindo o coeficiente de partição entre a fibra e a matriz, diminuindo a extração. Nestes experimentos, o efeito relacionado à difusão do analito foi mais importante.

A interação entre os parâmetros tempo e temperatura foi positiva, o que indica que a extração aumenta quando o tempo e a temperatura são aumentados simultaneamente.

O pH apresentou efeito negativo na extração, mas este efeito não foi significativo. Quando pH 9,0 foi utilizado, a extração foi maior do que quando pH 11,0 foi usado. A FLU é

uma base fraca e tem pK_a de 8,7. Portanto, está completamente neutra em pH 11,0, favorecendo a extração pela fibra. No entanto, extração maior ocorreu em pH 9,0. Em fibras como PDMS e PA somente a fração neutra dos compostos é extraída. Por outro lado, usando fibras de PDMS-DVB alguns outros tipos de interação podem ocorrer, o que poderia explicar a extração maior em pH 9,0.

Dessa forma, as condições otimizadas para a extração empregando a fibra PDMS-DVB foram: 50 minutos, 50 °C, sem NaCl e pH 9,0. A Figura 1.26 apresenta a curva de cinética de extração para a FLU nas condições otimizadas. Pode-se perceber que o tempo de 40 minutos foi suficiente para se atingir o equilíbrio. Entretanto, o tempo de 30 minutos foi escolhido, considerando-se que há um bom compromisso entre tempo e quantidade extraída. Além disso, as extrações foram feitas sempre no mesmo tempo, o que garante boa reprodutibilidade para análises quantitativas.

Figura 1.26. Curva cinética da extração para a fluoxetina nas seguintes condições: fibra PDMS-DVB, 50 °C, sem sal, pH 9,0 e agitação a 1100 rpm.

Valores elevados de tempo e temperatura (50 minutos e 50 °C) aumentaram a extração da FLU, quando se utilizou fibra CW-TPR. O pH também aumentou a extração quando o maior valor (pH 11,0) foi usado. O efeito da força iônica não ficou muito claro, sendo feito mais um experimento para verificar o efeito da adição de NaCl na extração. A Figura 1.27

apresenta um diagrama de Pareto com nove experimentos onde pode ser observado que maior extração é alcançada quando NaCl não é usado. Dessa forma, as condições em que há melhor extração para a fibra CW-TPR foram: 50 minutos, 50 °C, sem NaCl, pH 11,0. No entanto, valores de pH elevados, como pH 11,0, danificam a fibra CW-TPR, sendo necessário utilizar valores menores de pH.

Figura 1.27. Diagrama de Pareto mostrando os efeitos dos parâmetros avaliados para a fibra CW-TPR.

A Figura 1.28 mostra o cubo de respostas obtido com nove experimentos onde os valores de área obtidos estão apresentados. A curva de cinética de extração para a fluoxetina nas seguintes condições: 50 °C, sem NaCl e pH 11,0 é apresentada na Figura 1.29.

Figura 1.28. Cubo de respostas com valores de área obtidos para nove experimentos para a fibra CW-TPR.

Figura 1.29. Curva de cinética de extração para a fluoxetina nas seguintes condições: fibra CW-TPR, 50 °C, sem sal, pH 11,0 e agitação a 1100 rpm.

A fibra PDMS-DVB foi escolhida para validar o método de análise de FLU e nor-FLU em plasma pois a quantidade extraída foi maior que aquela obtida com a fibra CW-TPR em pH 9,0. Ademais, PDMS-DVB é mais resistente a altos valores de pH, quando comparada com a fibra CW-TPR.

A Figura 1.30 apresenta os cromatogramas obtidos quando a dessorção foi feita nos modos *off-line*, *on-line* sem aquecimento (25 °C) e *on-line* com aquecimento (60 °C). Os valores de área obtidos com a interface sem aquecimento foram cerca de duas vezes maiores do que aqueles obtidos no modo *off-line*. Quando se utilizou a interface com aquecimento os valores de área foram cerca de três vezes maiores quando comparados com aqueles do modo *off-line*. Os resultados obtidos com a utilização da interface *homemade* foram melhores, quando comparados àqueles obtidos no modo *off-line*, por duas razões diferentes. Em primeiro lugar, porque a interface permite que todo o analito dessorvido seja introduzido no cromatógrafo, diferentemente do modo *off-line*, onde apenas parte da solução é injetada. Em segundo lugar, a interface possui um sistema de aquecimento na câmara de dessorção, o que aumenta a transferência de massa do analito da fibra para o solvente, aumentando a dessorção. Além disso o aumento de temperatura reduz o coeficiente de partição do analito entre a fibra e a matriz, fazendo com que o analito se desloque para o solvente.

Figura 1.30. Cromatogramas de FLU e nor-FLU a 500 ng mL^{-1} e CLO a 1000 ng mL^{-1} extraídos nas seguintes condições: fibra PDMS-DVB, 30 minutos, 50°C , sem sal, pH 9,0. Dessorção realizada nos modos *off-line* e *on-line* com (60°C) e sem (25°C) aquecimento.

A Figura 1.31 ilustra o aumento na área dos picos da FLU e nor-FLU com o aumento da temperatura da câmara de dessorção da interface. Os valores de área aumentaram quando a temperatura foi aumentada de 25°C até 60°C , demonstrando um aumento da dessorção dos analitos. Em 70°C ocorreu uma diminuição das áreas, provavelmente pela evaporação do solvente na câmara, sendo observado o mesmo fenômeno em 80°C . Porém, isto ocorreu com uma intensidade ainda maior, o que pôde ser observado pelos reduzidos valores de áreas obtidos nessa temperatura. A acetonitrila, empregada como constituinte da fase móvel, possui ponto de ebulição de $81\text{--}82^\circ\text{C}$. Como a dessorção é realizada durante 15 minutos, este tempo parece ser suficiente para que ocorra a evaporação deste solvente a partir de 70°C . Assim, a temperatura de 60°C foi escolhida como a mais adequada para a realização deste método.

Figura 1.31. Efeito da temperatura na dessorção da FLU e nor-FLU.

Observou-se na Figura 1.31 que a variação de temperatura causou variações de área maiores para a nor-FLU do que para a FLU. Geralmente, o aumento de temperatura em cromatografia líquida reduz o tempo de retenção dos analitos. No processo de dessorção ocorre o mesmo com temperaturas mais elevadas. Assim, a transferência de massa aumenta com temperaturas maiores. De acordo com os dados obtidos, quando a temperatura aumentou de 25 °C para 60 °C os valores de área aumentaram de 86% para nor-FLU, 20% para FLU e 16% para CLO. Dessa forma, o aumento de temperatura parece exercer um efeito mais pronunciado no composto mais polar, que é a nor-FLU. A temperatura afeta a cinética de equilíbrio entre a fibra e a fase móvel mais acentuadamente para o composto mais polar. Em analogia com a cromatografia de fase reversa, a temperatura é conhecida por afetar mais os tempos de retenção dos compostos ionizáveis, dependendo do pK_a do analito e da fase móvel presente. É possível que diferenças de hidrofobicidade e pK_a afetem o efeito da temperatura na dessorção de analitos em diferentes intensidades.

4.4 VALIDAÇÃO

4.4.1 Especificidade

O método se mostrou específico, pois nenhum pico eluiu no mesmo tempo de retenção da FLU, nor-FLU ou CLO quando amostras de plasma branco foram analisadas (Figura 1.32).

Figura 1.32. Cromatogramas de plasma branco e plasma fortificado (FLU e nor-FLU a 25 ng mL^{-1} e CLO a 1000 ng mL^{-1}) obtido após extração nas seguintes condições: fibra PDMS-DVB, 30 minutos, 50°C , sem sal, pH 9.0 e dessorção *on-line* (60°C).

4.4.2 Linearidade e faixa de trabalho

A faixa de trabalho foi avaliada de 25 a 500 ng mL^{-1} . Os coeficientes de correlação foram maiores que 0,991 para FLU e nor-FLU, demonstrando haver uma correlação entre concentração e resposta obtida. As equações de regressão linear obtidas foram $Y = -0,021 + 0,0040X$ e $Y = 0,082 + 0,0018X$, para FLU e nor-FLU, respectivamente.

4.4.3 Precisão

O DPR obtido na avaliação da precisão intra-dia foi menor que 5,0% em todas as concentrações avaliadas. Na avaliação da precisão entre-dias, todos os valores de DPR% foram menores que 20%. Estes resultados demonstram que o método desenvolvido possui uma precisão adequada (Tabela 1.4).

Tabela 1.4. Valores de concentração e DPR% obtidos na avaliação da precisão intra-dia e entre-dias.

Concentração (ng mL ⁻¹)	Precisão intra-dia %RSD	Precisão entre-dias %RSD
25	3.54	16.81
50	4.53	n.a.*
100	2.26	11.00
200	3.65	n.a.
300	2.75	n.a.
500	3.29	6.88

*n.a.: não avaliado

4.4.4 Limites de quantificação e detecção

O LOQ foi estabelecido como sendo 25 ng mL⁻¹. Após cinco extrações nessa concentração, o DPR% obtido foi menor que 20,0%. O LOD para a FLU e nor-FLU foram estabelecidos como a concentração onde o pico do analito era duas vezes maior que o ruído da linha de base. O LOD foi de 10 ng mL⁻¹ para FLU e 5 ng mL⁻¹ para nor-FLU.

4.4.5 Recuperação

Os valores de recuperação obtidos estão apresentados na Tabela 1.5.

Tabela 1.5. Valores de recuperação para FLU e nor-FLU obtidos nas três concentrações avaliadas.

Concentração (ng mL ⁻¹)	Recuperação (%)	
	FLU	nor-FLU
25	6.81	10,54
100	3.91	4,29
500	1.94	2,67

Quando comparada a outras técnicas de extração, esses valores de recuperação podem ser considerados baixos. No entanto, são valores comuns em SPME, considerando-se que esta é uma técnica em microescala, na qual a extração não é exaustiva [7]. Além disso, as extrações foram realizadas em 30 minutos, antes do equilíbrio ser alcançado.

Os valores de recuperação foram diferentes para as concentrações de 25, 100 e 500 ng mL⁻¹, pois as proteínas plasmáticas adsorveram progressivamente sobre a fibra, diminuindo a quantidade de analito extraída. Como as análises começaram pela menor concentração (25 ng mL⁻¹) a recuperação foi menor para a concentração mais alta (500 ng mL⁻¹), pois mais proteínas haviam adsorvido sobre a fibra nessa concentração. Entretanto, isso não prejudica a análise, pois utiliza-se um padrão interno.

5 CONCLUSÕES

As colunas empacotadas se mostraram adequadas para análise de FLU e nor-FLU, permitindo boa eficiência, tempo de análise curto e adequada resolução em relação ao padrão interno. A coluna de menor comprimento (5 cm) permitiu que a FLU e a CLO eluíssem da coluna em tempo muito pequeno, permitindo uma corrida cromatográfica bem rápida (em torno de 2 minutos).

O planejamento fatorial empregado neste estudo permitiu otimizar racionalmente as condições utilizadas na extração de FLU em plasma por SPME. Fibra PDMS-DVB, 30 minutos, 50 °C, sem NaCl, pH 9,0, foram as melhores condições obtidas.

A interface com sistema de aquecimento projetada e construída no Laboratório de Cromatografia melhorou sensivelmente o processo de dessorção, aumentando os valores de área em cerca de 3 vezes, quando comparado com a dessorção no modo *off-line*, além de reduzir o efeito de memória. O emprego de temperatura mais elevada que a ambiente (60 °C) demonstrou contribuir para o aumento da dessorção. A avaliação do efeito da temperatura na dessorção contribuiu para demonstrar a eficiência do sistema de aquecimento utilizado na interface desenvolvida

O método desenvolvido apresentou precisão, linearidade, especificidade e limite de quantificação adequados para a análise de FLU e nor-FLU em plasma.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] MAJORS, R.E. An overview of sample preparation. **LC-GC**, v. 9, p. 16-20, 1991.
- [2] MAJORS, R.E. New approaches to sample preparation. **LC-GC**, v. 13, p. 82-94, 1995.
- [3] LACERDA, Cristina Alves. **Desenvolvimento de fibras para a microextração em fase sólida (SPME): caracterização e aplicação**. 2003. 127 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.
- [4] PAWLISZYN, J.; ARTHUR, C.L.; POTTER, D.W.; BUCHHOLZ, K.D.; MOTLAGH, S. Solid-phase microextraction for direct analysis of water: theory and practice. **LC-GC**, v. 10, p. 656-661, 1992.
- [5] VALENTE, A.L.P.; AUGUSTO, F. Microextração em fase sólida. **Quím. Nova**, v. 23, p. 523-529, 2000.
- [6] SMITH, R.M. Before the injection – modern methods of sample preparation for separation techniques. **J. Chromatogr. A**, v. 1000, p. 3-27, 2003.
- [7] PAWLISZYN, J. **Solid phase microextraction theory and practice**. Ontario: Wiley, 1997. 247 p.
- [8] PAWLISZYN, J.; ARTHUR, C.L. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Anal. Chem.**, v. 62, p. 2145-2148, 1990.
- [9] GÓRECKI, T.; YU, X.; PAWLISZYN, J. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. **The Analyst**, v. 124, p. 643-649, 1999.
- [10] QUEIROZ, M E.C.; LANÇAS, F.M. Practical tips on preparing plasma samples for drug analysis using SPME. **LC-GC**, v. 22, p. 970-980, 2004.
- [11] ALPENDURADA, M.F. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. **J. Chromatogr. A**, v. 889, p. 3-14, 2000.

- [12] LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. **J. Chromatogr. A**, v. 902, p. 17-63, 2000.
- [13] SILVA, José Carlos Rodrigues. **Projeto, construção e avaliação de um sistema para cromatografia a gás solvatante**. 2002. 258 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.
- [14] SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 1450 p.
- [15] WONG, D.T.; BYMASTER, F.P.; ENGLEMAN, E.A. Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. **Life Sci.**, v. 57, p. 411-441, 1995.
- [16] VASWANI, M.; LINDA, F.K.; RAMESH, S. Role of selective serotonin uptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. **Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 27, p. 85-102, 2003.
- [17] HIEMKE, C.; HÄRTTER, S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. **Pharmacol. Ther.**, v. 85, p. 11-28, 2000.
- [18] HEIKKINEN, T.; EKBLAD, U.; PALO, P.; LAINE, K. Pharmacokinetics of fluoxetine and norfluoxetine in pregnancy and lactation. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 73, p. 330-337, 2003.
- [19] ANDERSON, I.M. The new antidepressants. **Curr. Anaesth. Crit. Care**, v. 10, p. 32-39, 1999.
- [20] NORMAN, T.R.; GUPTA, R.K.; BURROWS, G.D.; PARKER, G.; JUDD, F.K. Relationship between antidepressant response and plasma concentration of fluoxetine and norfluoxetine. **Int. Clin. Psychopharmacol.**, v. 8, p. 25-29, 1993.
- [21] FERGUSON, J.; HILL, H. The pharmacokinetics of fluoxetine in elderly volunteers ages 65-85. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v. 13, p. S181, 2003.
- [22] RAGGI, M.A.; MANDRIOLI, R.; CASAMENTI, G.; BUGAMELLI, F.; VOLTERRA, V. Determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma by high pressure liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 18, p. 193-199, 1998.

- [23] RAGGI, M.A.; MANDRIOLI, R.; CASAMENTI, G.; VOLTERRA, V.; DESIDERIO, C.; FANALI, S. Improved HPLC determination of fluoxetina and norfluoxetina in human plasma. **Chromatographia**, v. 50, p. 423-427, 1999.
- [24] CLAUSING, P.; RUSHING, L.G.; NEWPORT, G.D.; BOWYER, J.F. Determination of D-fenfluramine, D-norfenfluramine and fluoxetine in plasma, brain tissue and brain microdialysate using high-performance liquid chromatography after precolumn derivatization with dansyl chloride. **J. Chromatogr. B**, v. 692, p. 419-426, 1997.
- [25] MOLANDER, P.; THOMASSEN, A.; KRISTOFFERSEN, L.; GREIBROKK, T.; LUNDANES, E. Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine, paroxetine and their metabolites in plasma by temperature-programmed packed capillary liquid chromatography with on-column focusing of large injection volumes. **J. Chromatogr. B**, v. 766, p. 77-87, 2002.
- [26] ALVAREZ, J.C.; BOTHUA, D.; COLLIGNON, I.; ADVENIER, C.; VAROQUAUX, O.S. Determination of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in serum and brain areas using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **J. Chromatogr. B**, v. 707, p. 175-180, 1998.
- [27] MAYA, M.T.; DOMINGOS, C.R.; GUERREIRO, M.T.; MORAIS, J.A. Determination of the antidepressant fluoxetine in plasma by LC with UV detection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 23, p. 989-996, 2000.
- [28] SOUVERAIN, S.; MOTTAZ, M.; CHERKAoui, S.; VEUTHEY, J.L. Rapid analysis of fluoxetine and its metabolite in plasma by LC-MS with column-switching approach. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 377, p. 880-885, 2003.
- [29] SANTOS NETO, A.J.; RODRIGUES, J.C.; FERNANDES, C.; TITATO, G.M.; LANÇAS, F.M. Automated microcolumn-switching system for drug analysis by direct injection of human plasma. **J. Chromatogr. A**, v. 1105, p. 71-76, 2006.
- [30] SALGADO-PETINAL, C.; PABLO LAMAS, J.; GARCIA-JARES, C.; LLOMPART, M.; CELA, R. Rapid screening of selective serotonin re-uptake inhibitors in urine samples using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 382, p. 1351-1359, 2005.
- [31] LAMAS, J.P.; SALGADO-PETINAL, C.; JARES, C.G.; LLOMPART, M.; CELA, R.; GÓMEZ, M.. Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of selective serotonin reuptake inhibitors in environmental water. **J. Chromatogr. A**, v. 1046, p. 241-247, 2004.

[32] GUIOCHON, G.; FARKAS, T.; GUAN-SAJONZ, H.; KOH, J.H.; SARKER, M.; STANLEY, B.J.; YUN, T. Consolidation of particles beds and packings of chromatographic columns. **J. Chromatogr. A**, v. 762, p. 83-88, 1997.

[33] MAJORS, R.E. Advances in HPLC column packing design. **LC-GC Europe**. v. 6, p. 2-7, 2003.

[34] GUIOCHON, G.; SARKER, M. Consolidation of the packing material in chromatographic columns under dynamic axial compression – I. Fundamental study. **J. Chromatogr. A**, v. 704, p. 247-268, 1995.

[35] POOLE, C.F. Progress in packed column supercritical fluid chromatography: materials and methods. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 43, p. 3-23, 2000.

[36] BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1995. 299 p.

2

Extração por sorção em barra de agitação (SBSE) na determinação de fluoxetina em plasma

Não existe nada mais fatal para o pensamento que o ensino de respostas certas. Para isso existem as escolas: não para ensinar as respostas, mas para ensinar as perguntas. As respostas nos permitem andar sobre a terra firme. Mas somente as perguntas nos permitem entrar pelo mar desconhecido.

Rubem Alves

2

Extração por sorção em barra de agitação (SBSE) na determinação de fluoxetina em plasma

1 INTRODUÇÃO

1.1 EXTRAÇÃO POR SORÇÃO EM BARRA DE AGITAÇÃO (SBSE)

Extração por sorção em barra de agitação (SBSE) é uma técnica recente de preparo de amostras. É baseada na utilização de uma barra de agitação, geralmente incorporada em um tubo de vidro, coberta com uma camada de polidimetilsiloxano (PDMS) (Figura 2.1). A barra é introduzida na amostra aquosa e a extração ocorre durante a agitação. Após certo tempo de agitação a barra é removida da amostra e os analitos são dessorvidos. A quantidade de PDMS pode variar com o tamanho da barra e a espessura do filme (Tabela 2.1) [1].

Figura 2.1. Esquema de uma barra SBSE.

Tabela 2.1. Barras SBSE disponíveis comercialmente.

Comprimento do filme (mm)	Espessura do filme (mm)	Volume (μL)
10	0,5	24
10	1,0	63
20	0,5	47
20	1,0	126

A teoria da SBSE é simples e muito similar àquela da SPME. Além disso, todos os parâmetros que afetam a extração por SPME, tais como pH, temperatura, força iônica, tempo de extração, velocidade de agitação e presença de solvente também atuam sobre a extração por SBSE.

Considerando que os coeficientes de partição PDMS-água ($K_{PDMS/W}$) são proporcionais aos coeficientes de partição octanol-água ($K_{O/W}$), pode ser estabelecido que:

$$K_{O/W} \approx K_{PDMS/W} = \frac{C_{SBSE}}{C_W} = \frac{m_{SBSE}}{m_w} \times \frac{V_W}{V_{SBSE}} \quad (1)$$

onde C_{SBSE} e C_W são as concentrações do analito na barra SBSE e na fase aquosa, respectivamente, m_{SBSE} e m_w são as massas dos analitos na barra SBSE e na fase aquosa, respectivamente, e V_{SBSE} e V_W são os volumes das fases SBSE e aquosa, respectivamente. Introduzindo o termo β , denominado razão de fases (V_W/V_{SBSE}), pode-se reescrever a equação acima como:

$$\frac{K_{O/W}}{\beta} = \frac{m_{SBSE}}{m_w} = \frac{m_{SBSE}}{m_0 - m_{SBSE}} \quad (2)$$

onde m_0 é a quantidade total de analito originalmente presente na amostra aquosa. Finalmente, a equação pode ser transformada de forma a expressar a eficiência de extração ou recuperação:

$$R = \frac{m_{SBSE}}{m_0} = \frac{\left(\frac{K_{O/W}}{\beta}\right)}{1 + \left(\frac{K_{O/W}}{\beta}\right)} \quad (3)$$

Durante o processo de extração os analitos se distribuem entre a fase aquosa da matriz e a camada de PDMS, sendo a razão da constante de partição do analito e a relação entre as duas fases (PDMS e água) o único parâmetro que governa a recuperação [2].

A Figura 2.2 ilustra a recuperação de um analito em função da razão $K_{O/W}/\beta$. Em um valor de $K_{O/W}/\beta = 1$ a recuperação é de 50%. Em valores baixos de $K_{O/W}/\beta$ a recuperação é proporcional a $K_{O/W}/\beta$, enquanto para valores de $K_{O/W} / \beta$ maiores que 5 a extração é essencialmente quantitativa.

Figura 2.2. Recuperação como uma função da razão coeficiente de partição e razão de fases ($K_{O/W} / \beta$) para extrações por SPME e SBSE. Adaptado de [2].

Em SPME, o volume máximo de PMDS na fibra é de aproximadamente 0,5 μ L (para uma fibra de 100 μ m de espessura). Para uma amostra típica de 10 mL o valor de β é de $2 \cdot 10^4$. Isso significa que uma extração quantitativa só será obtida para compostos com um $K_{O/W}$ maior que 10^5 .

Em SBSE a condição se torna mais favorável. Uma barra de 100 μ L de PDMS pode ser facilmente utilizada para extrair 10 mL de fase aquosa ($\beta = 100$). Nesse caso, analitos com $K_{O/W}$ maiores que 500 são quantitativamente extraídos pela barra. A Figura 2.3 ilustra a recuperação de analitos obtida com SBSE e SPME em amostra aquosa (10 mL). Pode-se verificar que extrações quantitativas são obtidas com valores muito mais baixos de $K_{O/W}$ para SBSE do que para SPME, sendo a única causa a diferença da razão de fases β [2].

Figura 2.3. Recuperação teórica de analitos em SBSE e em SPME de uma amostra aquosa (10 mL) como função do seu coeficiente de partição octanol-água. Volume de PDMS na fibra SPME: 0,5 μ L; volume de PDMS na barra SBSE: 100 μ L. Adaptado de [2].

A SBSE é comumente combinada com dessorção térmica e cromatografia gasosa (SBSE-TD-GC), sendo um sistema simples e muito sensível para a análise de compostos voláteis e semi-voláteis. No entanto, a dessorção empregando solventes tem encontrado muitas aplicações para a análise de compostos de elevada massa molecular e termolábeis, sendo possível a utilização da cromatografia líquida [2,3].

O PDMS possui algumas características que o tornam adequado para o enriquecimento de analitos em amostras aquosas, podendo-se citar: os coeficientes de distribuição PDMS-água são muito próximos daqueles octanol-água, elevada inércia, estabilidade térmica (de -100 °C a 350 °C), boa performance de enriquecimento mesmo para analitos polares e seus produtos de degradação são pouco intensos, muito específicos e de fácil identificação utilizando detectores de espectrometria de massas (MS) [3]. Além disso, os analitos não são retidos em superfícies ativas como ocorre com materiais adsorbentes, mas são particionados (ou sorvidos) e retidos dentro do sorbente. Considerando que a sorção é um processo mais fraco que a adsorção, a degradação de analitos instáveis é significativamente menor em PDMS do que em materiais adsorbentes. Ademais, devido à fraca interação com os analitos, estes podem ser dessorvidos em baixas temperaturas, minimizando a perda de compostos

termolábeis. Por último, a capacidade de extração para um determinado analito não é influenciada pela presença de elevada quantidade de água, ou outros analitos, pois todos os solutos possuem seu próprio equilíbrio de partição na fase PDMS e deslocamentos não ocorrem [2].

A SBSE foi inicialmente utilizada para a análise de poluentes orgânicos em água. No entanto, ultimamente, tem sido avaliada sua utilização no enriquecimento de compostos, tais como fármacos, em fluidos biológicos como plasma e urina [3-11]. No entanto, o número de estudos empregando SBSE especificamente para a análise de fármacos ainda é bastante reduzido.

Dessa forma, a SBSE se apresenta como uma excelente alternativa para o preparo destas amostras, sendo este um campo fértil para pesquisas. Deve-se destacar que até o presente momento nenhum trabalho que utilizasse SBSE para a análise de fluoxetina foi encontrado na literatura.

1.2 DERIVATIZAÇÃO DE AMINAS

A cromatografia gasosa (GC) tem sido amplamente utilizada para a análise de aminas devido às suas características de simplicidade, elevado poder de resolução, alta sensibilidade, reduzido tempo de análise e baixo custo [12].

De uma forma geral, aminas podem ser separadas nas suas formas livres utilizando-se fases estacionárias de elevada basicidade. As amostras são analisadas após adição de uma base por injeção direta, por *headspace* ou extraídas por um solvente orgânico antes da análise. No entanto, a análise de aminas livres por GC é dificultada pois elas tendem a sofrer adsorção e decomposição nas colunas, originam picos com cauda, picos “fantasmas” e baixa sensibilidade de detecção. A tendência de adsorção no sistema analítico (frascos, sistema de

injeção, lâ de vidro e coluna) segue a seguinte ordem: amina primária > amina secundária > amina terciária, sendo ainda mais difícil a determinação de aminas alifáticas do que aminas aromáticas [12,13].

Métodos de derivatização têm sido muito utilizados para solucionar os problemas descritos acima. Eles têm sido empregados para reduzir a polaridade do grupo amino, tornar estes compostos voláteis e melhorar as propriedades do sistema GC. Além disso, estes métodos são utilizados para melhorar a detecção e separação dessas aminas. Os métodos mais comumente utilizados para a derivatização de aminas são acilação, sililação, dinitrofenilção e formação de diferentes produtos de condensação (bases de Schiff). Além desses procedimentos, outros também empregados são permetilação e formação de carbamatos, sulfonamidas e fosfonamidas [12,13].

Nesse estudo foram avaliados dois métodos diferentes para derivatização *in situ* da fluoxetina e do padrão interno (clomipramina e desipramina): acilação com anidrido acético e formação de carbamatos com cloroformato de etila.

A acilação é uma das técnicas mais populares para a derivatização de aminas primárias e secundárias (Esquema 2.1). Diferentes reagentes, tais como anidridos ácidos, cloretos de acila, acilimidazóis e acilamidas, têm sido empregados como reagentes de acilação. Esses compostos reagem facilmente com grupamentos amino em condições reacionais brandas [12].

Esquema 2.1. Esquema geral de acilação de aminas primárias e secundárias com anidridos ácidos. R = grupo alquila ou arila; R' = hidrogênio, alquila ou arila; R'' = -CH₃, -CF₃, -C₂F₅, C₃F₇.

A formação de derivados carbamatos (Esquema 2.2) é muito útil para a determinação de aminas primárias, secundárias e terciárias. Cloroformatos de alquila têm sido muito utilizados para esse fim. A reação de aminas com esses compostos pode ser facilmente realizada em meio alcalino aquoso, e os compostos resultantes têm boas propriedades no sistema GC. Nestas reações, um grupo alquila é adicionado ao nitrogênio da amina [12,13].

Esquema 2.2. Esquema geral de formação de derivados carbamatos. R = grupo alquila ou arila; R' = hidrogênio, alquila ou arila; R'' = -C₂H₅, -CH₂CH(CH₃)₂, -C₅H₁₂, CH₂CF₃.

2 OBJETIVOS

- Desenvolver método para a análise de fluoxetina em plasma empregando o acoplamento SBSE-GC-MS.
- Avaliar a utilização de diferentes processos de derivatização *in situ* da fluoxetina para análise em GC.
- Otimizar as condições da SBSE, tais como tempo de extração, tempo de desorção e solvente para dessorção.
- Utilizar e comparar os resultados da dessorção com solventes e dessorção térmica.
- Validar o método SBSE-GC-MS, avaliando os parâmetros precisão, linearidade, especificidade, limite de quantificação e limite de detecção.
- Desenvolver método para a análise de fluoxetina em plasma empregando o acoplamento SBSE-LC-MS.
- Otimizar as condições da SBSE, tais como tempo de extração e solvente para dessorção.
- Otimizar as condições cromatográficas.
- Otimizar as condições do detector MS.

- Validar o método SBSE-LC-MS, avaliando os parâmetros precisão, linearidade, especificidade, limite de quantificação, limite de detecção e recuperação.
- Comparar os resultados obtidos com os acoplamentos SBSE-GC-MS e SBSE-LC-MS.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 PADRÕES E REAGENTES

Os padrões analíticos de desipramina (DES) (Figura 2.4b), clomipramina (CLO) (Figura 2.4c), utilizados como padrão interno (PI) e fluoxetina (FLU) (Figura 2.4a), foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

Foram usados também tetraborato de sódio, cloroformato de etila, diclorometano (Merck, Darmstad, Alemanha), metanol, acetonitrila (Biosolve, Walkenswaard, Holanda), ácido tricloroacético, piridina, etanol absoluto, acetona, anidrido acético, água para HPLC (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), acetato de etila (Riedel de Haën, Seelze, Alemanha), acetato de amônio, carbonato de sódio anidro, ácido acético (Fluka, Steiheim, Alemanha) e tolueno (Fisher Scientific, Leicestershire, Inglaterra). Todos os solventes e reagentes usados possuíam grau HPLC ou analítico. Amostras de plasma foram gentilmente cedidas pela Cruz Vermelha em Ghent (Ghent, Bélgica) e mantidas congeladas em freezer a -20 °C.

Figura 2.4. Estruturas da fluoxetina (a), desipramina (b) e clomipramina (c).

3.2 MATERIAIS

- Frasco para extração de 20 mL com tampa de alumínio (Agilent Technologies, Little Falls, EUA).
- Barras para extração (SBSE) com revestimento de PDMS (10 mm x 0,5 mm; 24 µL) (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Alemanha).

3.3 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica Sartorius BL120S.
- Bomba para HPLC Kontron Instruments.
- Desgaseificador Uniflows DG-1310.
- Agitador magnético Komet Variomag Poly.
- Banho de ultra-som Branson 2510.
- Cromatógrafo líquido HP Series 1050 com detector UV.
- Espectrômetro de massas Finnigan MAT LCQTM Benchtop LC/MSⁿ com analisador do tipo *ion trap*.
- Cromatógrafo gasoso Agilent 6890N com injetor automático (7683 Series) e detector MS (5973 inert).
- Cromatógrafo gasoso HP 5890 Series II com detector MSD 5972 Series.
- Cromatógrafo gasoso Agilent 6890 com detector MSD 5973 acoplado a um sistema de dessorção térmica Gerstel TDS G com autoinjeter Gerstel TDS A2 (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Alemanha).
- Injetor com programação de temperatura (PTV, CIS-4, Gerstel).

3.4 MÉTODO SBSE-GC-MS

3.4.1 Precipitação das proteínas do plasma

Os testes iniciais foram realizados utilizando água ao invés de plasma, para facilitar os procedimentos de derivatização. Posteriormente, empregou-se plasma centrifugado por 20 minutos a 4000 rpm e filtrado em membrana de 0,22 µm. Como se empregaram solventes (etanol e piridina) para a etapa de derivatização, as proteínas do plasma precipitavam, dificultando a extração.

Dessa forma, foi necessário precipitar as proteínas antes do processo de extração. Diferentes precipitantes foram testados: acetonitrila (na proporção 1,5:1), etanol (2:1) e ácido tricloroacético (0,5:1). Após a adição destes compostos o plasma foi submetido ao vórtex por um minuto, deixado em repouso por 20 minutos a 4 °C e centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm. As amostras foram preparadas em duplicata. As áreas obtidas após a extração foram comparadas para a escolha do agente precipitante mais adequado.

3.4.2 Derivatização dos analitos

A etapa de derivatização foi empregada objetivando melhorar o perfil dos picos, considerando que a FLU e a CLO (padrão interno) são compostos básicos e originam picos com caudas quando utilizados em cromatografia gasosa, nas condições descritas acima.

Duas reações de derivatização foram avaliadas, sendo utilizados os seguintes reagentes:

- 5 mL de água + 0,5 g de carbonato sódio + 0,5 mL de anidrido acético
- 5 mL de água + 0,5 mL de etanol:piridina (2:1) + 0,1 mL de cloroformato de etila

O perfil dos picos obtidos foram comparados com aqueles obtidos sem derivatização.

Tampão borato foi utilizado para manter os analitos na forma não ionizada:

- 1 mL de água + 4 mL de tampão borato 50 mmol L⁻¹ pH 11

A reação empregando etanol:piridina e cloroformato de etila foi escolhida, pois foi a que apresentou melhor resultado, com o pico da FLU aparecendo sem cauda. No entanto, a CLO não foi detectada. Assim, o pH foi aumentado, empregando-se tampão borato 100 mmol L⁻¹ pH 13 ou carbonato de sódio, no lugar da água, como descrito abaixo. O objetivo foi tentar manter o pH próximo de 11, o que faria com que a CLO estivesse na forma não ionizada, facilitando a extração. Extração utilizando apenas água foi repetida para comparação, pois estas análises foram realizadas em um novo sistema GC-MS.

- 5 mL de água + 0,5 mL de etanol:piridina (2:1) + 0,1 mL de cloroformato de etila
- 1 mL de água + 4 mL de tampão borato 100 mmol L⁻¹ pH 13 + 0,5 mL de etanol:piridina (2:1) + 0,1 mL de cloroformato de etila
- 5 mL de água + 0,5 g de carbonato de sódio + 0,5 mL de etanol:piridina (2:1) + 0,1 mL de cloroformato de etila

A reação utilizando apenas etanol:piridina e cloroformato de etila foi escolhida e um novo padrão interno (DES) foi utilizado.

3.4.3 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas empregando-se coluna de sílica fundida HP5MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 μm – Agilent Technologies), com a seguinte programação de temperatura: início em 80 °C, aumento na velocidade de 30 °C min^{-1} até 280 °C, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos, em um tempo total de análise de 12,6 minutos. Utilizou-se hélio como gás de arraste à pressão de 15 psi. A temperatura do injetor foi de 250 °C e a do detector de 280 °C. As injeções foram realizadas no modo splitless. O detector foi utilizado no modo de impacto eletrônico positivo em 70 eV. Foram realizadas análises nos modos SCAN (m/z 40-500) e SIM (m/z 166 para FLU, 208 para DES e 269 para CLO).

3.4.4 Procedimento para amostras de plasma

Amostras de plasma fortificado foram transferidas para *vial* de 20 mL (fechados com tampa de alumínio após o início da extração) e o reagente de derivatização foi adicionado. A barra SBSE foi adicionada no *vial* sendo agitada por 30 minutos a 900 rpm em temperatura ambiente. Após extração a barra foi removida, lavada com água destilada e secada com papel absorvente. Para a dessorção com solventes, após a extração, a barra foi colocada em um *vial* de 200 μL com solvente (150 μL), submetida ao ultra-som, e a solução (1 μL) foi injetado no sistema GC-MS. Para a dessorção térmica a barra foi colocada em um tubo de vidro (187 mm de comprimento, 6 mm de diâmetro externo e 4 mm de diâmetro interno) e transferida para o sistema TDS-GC-MS (Figura 2.5). Após cada extração as barras eram limpas por 3 horas a 300 °C em um fluxo de hélio, dessorvidas termicamente ou com solventes, sendo avaliado se algum pico era observado no mesmo tempo de retenção da FLU, CLO ou DES. Esse procedimento foi utilizado para evitar o efeito de memória.

Figura 2.5. Esquema do sistema de dessorção térmica (adaptado de www.gerstel.com).

3.4.5 Otimização do método

Diferentes solventes utilizados para a dessorção dos analitos foram testados e comparados: acetonitrila, acetona, acetato de etila e tolueno. As amostras foram preparadas em duplicata e o volume utilizado foi de 150 μ L.

O tempo necessário para a dessorção também foi avaliado. As amostras foram colocadas em banho de ultra-som por 15, 30 e 60 minutos, em duplicata.

O tempo de extração, ou seja, o tempo necessário para que a partição do analito entre as fases aquosa e de PDMS atinja o equilíbrio foi também avaliada, nos tempos de 15, 30, 60, 180 e 360 minutos, construindo-se uma curva que representa a cinética de extração. As amostras foram preparadas em duplicata.

As amostras foram analisadas utilizando dessorção com solvente e dessorção térmica e os resultados foram comparados. Para a dessorção térmica foi empregada a seguinte programação de temperatura: de 35 °C a 300 °C (mantido nesta temperatura por 5 minutos) à velocidade de 60 °C min^{-1} . Um injetor PTV (programmed-temperature-vaporization, CIS-4, Gerstel) foi utilizado para focalização criogênica dos analitos dessorvidos da barra. O PTV foi

resfriado a $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ com nitrogênio líquido. Injeção no modo splitless foi realizada aumentando-se a temperatura do injetor PTV de $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ para $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ à velocidade de $600\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

3.4.6 Validação

Avaliou-se a especificidade do método analisando-se amostras de plasma branco oriundas de três pacientes diferentes. A presença de interferentes eluindo no mesmo tempo de retenção da FLU ou DES foi avaliada.

A linearidade foi avaliada analisando-se amostras de plasma fortificado nas concentrações de 1, 25, 50, 100, 200 e 500 ng mL^{-1} , com duas replicatas em cada ponto e utilizando DES na concentração de 1000 ng mL^{-1} como padrão interno. Empregou-se o método dos mínimos quadrados para o cálculo do coeficiente de correlação (R^2) e da equação linear de regressão.

Utilizando-se cinco amostras de FLU na concentração de 500 ng mL^{-1} e DES a 1000 ng mL^{-1} calculou-se a precisão intra-dia. A precisão inter-dias foi verificada nas mesmas concentrações por meio de análises realizadas em dois dias diferentes. A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR%).

O limite de quantificação (LOQ) foi determinado analisando-se amostras de FLU na concentração de 1 ng mL^{-1} e calculando-se a relação sinal-ruído, que deveria ser de dez. O limite de detecção (LOD) foi considerado como a menor concentração onde o pico do analito fosse três vezes maior que o ruído da linha de base.

3.5 MÉTODO SBSE-LC-MS

3.5.1 Condições cromatográficas

Derivatização da FLU e DES empregando 0,5 mL de etanol:piridina (2:1) e 0,1 mL de cloroformato de etila foi avaliada. O objetivo foi reduzir a cauda dos picos, permitindo a análise sem a utilização de trietilamina, comum na análise de compostos básicos, e que reduz a sensibilidade no detector de massas.

Diferentes fases móveis foram testadas objetivando obter adequada resolução e tempo de análise reduzido:

- Acetonitrila:tampão acetato de amônio 20 mmol L⁻¹ pH 4,8 (50:50)
- Acetonitrila:tampão acetato de amônio 10 mmol L⁻¹ pH 4,8 (50:50)
- Acetonitrila:tampão acetato de amônio 5 mmol L⁻¹ pH 4,8 (50:50)

Não se observou diferenças quando tampões de diferentes concentrações foram utilizados. Assim, o tampão 5 mmol L⁻¹ foi escolhido, pois é mais adequado para o uso com detector de massas. O uso de acetonitrila e metanol em diferentes proporções foi também comparado. Estes testes foram realizados em um cromatógrafo líquido HP Series 1050 com detector UV (227 nm). Foram testados DES e CLO como padrões internos.

Duas colunas foram avaliadas: Phase Sep *pH stable* C18 (100 x 2 mm, 3 µm) empacotada *in house* e Phenomenex Luna C18 (100 x 2 mm, 3 µm). A fase móvel utilizada foi metanol:tampão acetato de amônio 5 mmol L⁻¹ pH 4,8 (60:40), com fluxo de 0,2 mL min⁻¹ e volume injetado de 20 µL.

A validação foi realizada utilizando um detector de massas Finnigan MAT LCQ™ Benchtop LC/MSⁿ System.

3.5.2 Precipitação das proteínas do plasma

Após fortificar o plasma com FLU e o padrão interno, ácido tricloroacético 10% (p/V) foi adicionado. O plasma foi submetido ao vórtex por 1 minuto, deixado em repouso por 20 minutos a 4 °C e centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi utilizado para as etapas posteriores.

3.5.3 Procedimento para amostras de plasma

Um mL de plasma fortificado com FLU e o padrão interno e 4 mL de tampão borato 100 mmol L⁻¹ pH 11 foram adicionado em um *vial* de 20 mL com tampa de alumínio. A barra foi adicionada, sendo realizado os mesmo procedimentos descritos em 3.4.4.

3.5.4 Extração e dessorção

Diferentes solventes (150 µL) utilizados para a etapa de dessorção foram avaliados e comparados: acetonitrila, acetato de etila (com secagem e posterior diluição em 100 µL de fase móvel) e metanol (com injeção direta após a dessorção e com diluição em água na proporção 60:40).

O tempo de extração também foi avaliado: 15, 30, 60, 180 e 360 minutos. Foi construída uma curva de cinética de extração para a FLU e DES. As amostras foram feitas em duplicata.

3.5.5 Otimização das condições do detector de massas

O detector MS foi utilizado no modo de ionização positivo, equipado com ionização por electrospray, sendo as análises feitas no modo MIM (*multiple ion monitoring*) dos íons m/z 309,6 para FLU e 266,8 para DES.

Os parâmetros voltagem do capilar e lentes foram otimizados automaticamente pelo sistema (por meio da infusão de FLU e DES na fase móvel), mantendo-se constantes os seguintes parâmetros: gás auxiliar (50 unidades arbitrárias), gás secante (15 unidades arbitrárias), voltagem do spray (5,40) e temperatura (275 °C). Em seguida os parâmetros gás auxiliar (20, 50, 80 e 86 unidades arbitrárias), gás secante (10, 20, 40 e 60 unidades arbitrárias) e temperatura (150, 200, 250 e 300 °C) foram variados e otimizados em sequência, mantendo os outros parâmetros fixos.

3.5.6 Validação

Os parâmetros especificidade, linearidade, precisão, limites de quantificação e detecção foram avaliados como descrito no item 3.4.6.

A recuperação foi avaliada preparando-se amostras de FLU e DES nas mesmas concentrações que elas estariam se 100% destes compostos fossem extraídos. Foi avaliada em três concentrações de FLU (10 ng mL⁻¹, 100 ng mL⁻¹ e 500 ng mL⁻¹) e uma de DES (100 ng mL⁻¹). As concentrações finais encontradas em cada concentração foram:

- 10 ng mL⁻¹ em plasma – 40 ng após extração e dessorção
- 100 ng mL⁻¹ em plasma – 400 ng após extração e dessorção
- 500 ng mL⁻¹ em plasma – 2000 ng após extração e dessorção

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MÉTODO SBSE-GC-MS

4.1.1 Precipitação das proteínas do plasma

A extração obtida em plasma (área = 328.340) foi cerca de 7% da extração obtida em água (área = 4.727.414). Este valor baixo de extração deveu-se à precipitação das proteínas durante a extração, causada pela utilização de etanol e piridina.

A precipitação de proteínas foi empregada para limpeza da amostra, de forma a romper as ligações fármaco-proteínas e para evitar a precipitação durante a extração.

Os valores de área obtidos após a precipitação das proteínas com o uso de diferentes agentes precipitantes foram:

- acetonitrila (1,5:1): 786.175
- etanol (2:1): 404.750
- ácido tricloroacético 10% (p/V) (0,5:1): 1.225.613

Estas proporções foram utilizadas, pois são as que produzem cerca de 90% de precipitação das proteínas com a menor quantidade do agente precipitante [14]. Ácido tricloroacético 10% (p/V) na proporção 0,5:1 foi o que originou a melhor precipitação de proteínas, permitindo assim a melhor extração e a obtenção das amostras mais límpidas. Além disso, o ácido tricloroacético exibe excelente reprodutibilidade de precipitação, o que é essencial em análises quantitativas. Após precipitação com ácido tricloroacético a extração de FLU em plasma foi cerca de 80% da sua extração em água.

4.1.2 Derivatização dos analitos

A Figura 2.6 apresenta o cromatograma da FLU e CLO obtido sem derivatização. Os picos apresentaram cauda e baixa abundância. FLU e CLO possuem um grupamento amino em suas estruturas, produzindo picos com cauda em análises por GC devido às interações entre esse grupo e aqueles silanóis ácidos da coluna cromatográfica. Assim, derivatização foi empregada objetivando melhorar o perfil dos picos e aumentar a sensibilidade do método.

Figura 2.6. Cromatograma da FLU e CLO a 1000 ng mL^{-1} sem derivatização, modo SIM (m/z 104, 162, 85 e 269).

A Figura 2.7 ilustra um cromatograma típico dos analitos, obtido empregando-se carbonato de sódio e anidrido acético. Apenas o pico relativo à FLU (área = 417.763) apareceu.

Figura 2.7. Cromatograma da FLU e CLO a 1000 ng mL^{-1} após derivatização com carbonato de sódio e anidrido acético, modo SCAN.

Empregando-se a reação com etanol:piridina e cloroformato de etila apenas o pico relativo à FLU apareceu (Figura 2.8), mas com uma intensidade muito maior quando comparada à reação anterior (área = 38.637.508). A reação de aminas com cloroformatos de alquila (cloroformato de etila) (Figura 2.9) pode ser facilmente realizada em meio alcalino e o derivado carbamato produzido possui bom comportamento em análises por GC.

Figura 2.8. Cromatograma da FLU e CLO a 1000 ng mL^{-1} após derivatização com etanol-piridina e cloroformato de etila, modo SCAN.

Figura 2.9. Formação de derivado carbamato a partir da (a) FLU e (b) DES.

A Figura 2.10 apresenta novamente o cromatograma da FLU e CLO obtido após extração utilizando apenas etanol:piridina e cloroformato de etila, para comparação, pois foi realizado em outro equipamento. Como observado anteriormente apenas o pico da FLU apareceu (área = 13.250.234).

Figura 2.10. Cromatograma da FLU e CLO a 1000 ng mL^{-1} após derivatização com etanol-piridina e cloroformato de etila, modo SCAN.

Na Figura 2.11 observa-se um cromatograma típico da FLU e CLO, obtido após reação de derivatização com etanol:piridina, cloroformato de etila e tampão borato 100 mmol L⁻¹ pH 13. FLU e CLO apareceram (área FLU = 14.571.042 / área CLO = 1.637.053). CLO não foi derivatizado, como verificado após comparação do espectro obtido com o espectro padrão deste composto (Figura 2.12). A CLO possui um grupo amina terciário, o que dificulta a reação de derivatização. A área da FLU foi similar àquela obtida utilizando-se água ao invés do tampão borato.

Figura 2.11. Cromatograma da FLU e CLO a 1000 ng mL⁻¹ após derivatização com etanol-piridina, cloroformato de etila e tampão borato 100 mmol L⁻¹ pH 13, modo SCAN.

Figura 2.12. Espectro de massas da CLO não derivatizada.

O cromatograma da FLU e CLO obtido após derivatização com etanol:piridina, cloroformato de etila e carbonato de sódio está ilustrado na Figura 2.13. FLU e CLO apareceram (área FLU = 1.739.348 / área CLO = 2.638.953), mas a área da FLU foi reduzida de aproximadamente dez vezes quando comparada com as duas reações anteriores (o carbonato de sódio parece dificultar a reação de derivatização da FLU). No entanto, esta foi a melhor condição para a CLO, a qual novamente não foi derivatizada. O aumento da extração deveu-se ao aumento do pH e a manutenção do composto na forma não ionizada.

Figura 2.13. Cromatograma da FLU e CLO a 1000 ng mL^{-1} após derivatização com etanol-piridina, cloroformato de etila e carbonato de sódio, modo SCAN.

A condição empregando 5 mL de água, 0,5 mL de etanol:piridina (2:1) e 0,1 mL de cloroformato de etila foi escolhida pois foi aquela que apresentou os melhores resultados para a FLU e um novo padrão interno (DES), que possui um grupo amina secundário, foi escolhido com o objetivo de se obter um composto derivatizado e aumentar a sensibilidade.

FLU e DES foram derivatizados como verificado após análise de fragmentação destes compostos e observação dos espectros obtidos (Figuras 2.14 e 2.15) e apresentaram picos sem caudas e com boa resolução (FLU 7,8 min. e DES 10,6 min.). Os fragmentos com m/z 116 e 208 foram os picos bases para FLU e DES, respectivamente, sendo utilizados durante o

desenvolvimento do método. A Figura 2.16 apresenta um cromatograma obtido nestas condições.

Figura 2.14. Espectro de massas da FLU após derivatização.

Figura 2.15. Espectro de massas da DES após derivatização.

Figura 2.16. Cromatograma da FLU a 500 ng mL^{-1} e DES a 1000 ng mL^{-1} após derivatização com etanol-piridina e cloroformato de etila, modo SIM (m/z 116 e 208).

4.1.3 Otimização do método

A média das áreas obtidas ($n = 2$) com os diferentes solventes utilizados para a dessorção foi:

- Acetonitrila: 1.095.466
- Acetona: 1.083.651
- Acetato de etila: 2.521.165
- Tolueno: 3.032.918

Tolueno apresentou os melhores resultados. No entanto, este solvente encharca a barra dificultando sua retirada do *vial*. Assim, acetato de etila foi escolhido como solvente de dessorção.

A média das áreas obtidas ($n = 2$) nos diferentes tempos utilizados para a etapa de dessorção foi:

- 15 minutos: 1.612.664
- 30 minutos: 1.782.846
- 60 minutos: 1.603.430

O tempo de quinze minutos foi escolhido considerando-se o valor de área obtido (próximo àquele de trinta minutos) e a rapidez da análise.

As áreas obtidas em diferentes tempos de extração ($n = 2$) foram:

• 15 minutos: 356.307 – 350.933	$\bar{X} = 353.620$
• 30 minutos: 1.642.200 – 1.808.271	$\bar{X} = 1.725.235$
• 60 minutos: 1.571.967 – 1.768.287	$\bar{X} = 1.670.127$
• 180 minutos: 1.738.518 – 1.795.587	$\bar{X} = 1.767.052$
• 360 minutos: 1.903.639 – 1.702.600	$\bar{X} = 1.803.120$

A Figura 2.17 apresenta a curva cinética da extração obtida. O equilíbrio foi alcançado em 30 minutos, o que permite rapidez nas análises com máxima sensibilidade. Assim, este foi o tempo escolhido para a extração.

Figura 2.17. Curva cinética da extração obtida para a FLU e DES.

4.1.4 Validação

Nenhum pico foi encontrado nos tempos de retenção da FLU (7,8 minutos) e DES (10,6 minutos), como pode ser observado na Figura 2.18.

Figura 2.18. Cromatograma de plasma branco.

Na Tabela 2.2 estão apresentados os valores de área obtidos na avaliação da precisão intra-dia. O desvio padrão relativo (DPR) obtido foi de 5,53%, valor adequado para análises em plasma (foi considerado como limite máximo um DPR de 15,0%).

Tabela 2.2. Valores de área e DPR obtidos na avaliação da precisão intra-dia.

Área FLU	Área DES	FLU/DES	Média	DPR (%)
5030874	14467620	0,3477	0,3560	2,49
5735090	15699991	0,3653		
6132661	17280810	0,3549		
5967347	14900643	0,4005	0,3960	1,00
6105232	15528582	0,3932		
6030094	15297372	0,3942		
6268309	15377687	0,4076	0,4150	2,64
6261079	14643473	0,4276		
6617350	16147018	0,4098		
6265652	16658012	0,3761	0,3928	3,74
5931248	14686663	0,4039		
6134792	15404310	0,3983		
6136227	15407289	0,3983	0,3997	0,38
6288557	15743264	0,3994		
6087475	15167733	0,4013		
			0,3919	5,53

Os valores de área e DPR obtidos na avaliação da precisão inter-dias estão apresentados na Tabela 2.3. O DPR encontrado (12,91%) na avaliação da precisão inter-dias é considerado adequado para análises em fluidos biológicos.

Tabela 2.3. Valores de área e DPR obtidos na avaliação da precisão inter-dias.

Área FLU	Área DES	FLU/DES	Média	Média (1º dia)
9356482	30892418	0,3029	0,3003	0,3560
9231906	30340250	0,3043		
8117198	27635837	0,2937		
11959753	35678972	0,3352	0,3412	0,3960
11898594	35068391	0,3393		
11864838	33978315	0,3492		
6955290	23604687	0,2947	0,2898	0,4150
7280738	24865690	0,2928		
6632710	23516145	0,2820		
8912887	28902239	0,3084	0,3160	0,3928
8734082	27100809	0,3223		
8730209	27516769	0,3173		
6355469	20359624	0,3122	0,3222	0,3997
6289568	20457198	0,3075		
6343651	18294132	0,3468		
			Média (n = 10)	0,3529
			DPR (%)	12,91

Na Figura 2.19 é apresentada a curva analítica obtida. A Tabela 2.4 apresenta os valores de área obtidos na avaliação da linearidade. A equação da reta e o coeficiente de correlação obtidos foram: $Y = -5,95212E-5 + 7,83465E-4X$ e $R^2 = 0,994$, o que demonstra a linearidade do método.

Figura 2.19. Curva analítica obtida na análise de FLU em plasma.

Tabela 2.4. Valores de área obtidos na avaliação da linearidade.

Concentração (ng mL ⁻¹)	Área		FLU/DES	Média	DPR (%)
	FLU	DES			
1	9073	11157755	0,00081	0,00081	0,87
1	10149.5	12635246	0,00080		
25	172783.5	11395015	0,0152	0,0162	8,29
25	189343	11101627	0,0171		
50	326857.5	9761209.5	0,0335	0,0337	0,84
50	428875.5	12651158	0,0339		
100	822161	8945602	0,0919	0,0937	2,41
100	823012	8639722	0,0953		
200	1658167	11447783	0,1448	0,1501	4,99
200	1774493	11415310	0,1554		
500	5632875	15816140	0,3561	0,3917	5,53
500	6034224.3	15242199	0,3959		
500	6382246	15389393	0,4147		
500	6110564	15582995	0,3921		
500	6170753	15439429	0,3997		

Os limites de quantificação e detecção foram 30 pg mL⁻¹ e 10 pg mL⁻¹, respectivamente.

4.1.5 Dessorção térmica

Na Tabela 2.5 estão apresentados os resultados obtidos na avaliação da precisão utilizando o sistema de dessorção térmica. A precisão obtida foi considerada adequada, com DPR de 11,76%.

Tabela 2.5. Valores de área e DPR obtidos na avaliação da precisão com sistema de dessorção térmica..

Área FLU	Área DES	FLU/DES
2043932	1879017	1,0878
4126434	2886107	1,4298
2782483	2227303	1,2493
2756005	2130609	1,2935
2613858	2394537	1,0916
Média		1,2304
DPR (%)		11,76

Os limites de quantificação e detecção obtidos foram, respectivamente: 1,37 pg mL⁻¹ e 0,46 pg mL⁻¹, cerca de vinte vezes mais sensível quando comparado à dessorção com solvente. Isso ocorre pois na dessorção térmica todo o conteúdo presente na barra é introduzido no sistema analítico, ao contrário do que ocorre na dessorção com solventes, onde apenas uma parte (1 µL de um total de 150 µL, nesse caso) é introduzida.

Era esperado um LOQ de aproximadamente 150 vezes menor para a dessorção térmica, o que não ocorreu. As análises foram realizadas em sistemas diferentes e a menor sensibilidade obtida pode ser devida ao detector utilizado, que não possuía a mesma sensibilidade daquele usado para a dessorção com solvente.

A Figura 2.20 apresenta um cromatograma da FLU e DES obtidos utilizando o sistema de dessorção térmica.

Figura 2.20. Cromatograma da FLU a 50 ng mL^{-1} e DES a 100 ng mL^{-1} obtidos após derivatização e dessorção térmica.

4.2 MÉTODO SBSE-LC-MS

4.2.1 Condições cromatográficas

Diferentes sinais foram observados no detector de massas após derivatização com etanol-piridina e cloroformato de etila, não sendo possível, contudo, identificar aqueles correspondentes à FLU ou DES. Assim, optou-se por realizar as análises sem derivatizar os analitos.

A retenção dos analitos utilizando a coluna *homemade* foi muito intensa, além de originar caudas, sendo necessária a utilização de trietilamina, o que diminuiu a sensibilidade do detector de massas. Dessa forma, optou-se pela utilização da coluna Phenomenex Luna C18 (100 x 2 mm, 3 μm), que possui menos grupos silanóis disponíveis para a interação com

compostos básicos, como FLU e DES. O uso de trietilamina foi evitado, o que aumentou sensivelmente a sensibilidade do sistema.

Após a comparação das fases móveis com diferentes concentrações do tampão acetato de amônio foi observado que não havia diferença na eluição e perfil dos picos obtidos. Assim, foi escolhida a fase móvel com a mais baixa concentração (5 mmol L^{-1}) para que fosse possível a obtenção da maior sensibilidade no detector de massas.

Os tempos de retenção obtidos com o uso das fases móveis contendo metanol e acetonitrila em diferentes proporções estão demonstrados na Tabela 2.6. As análises foram feitas em duplicata.

Bons resultados (boa separação e tempo de análise reduzido) foram encontrados para as fases móveis:

- Acetonitrila (ACN):tampão acetato de amônio 5 mmol L^{-1} (40:60) – tempo de análise de 6 minutos para FLU e DES e 8 minutos para FLU e CLO.
- Metanol: tampão acetato de amônio 5 mmol L^{-1} (60:40) – tempo de análise de 9 minutos para FLU e DES e 13 minutos para FLU e CLO.

DES foi escolhida como padrão interno devido ao menor tempo de análise. Apesar da fase móvel contendo acetonitrila permitir um menor tempo de análise a fase móvel com metanol: tampão (60:40) foi escolhida devido à maior capacidade do metanol de doar prótons no modo positivo na fonte electrospray, aumentando a sensibilidade. Os íons de m/z 266,8 e 309,7 foram utilizados para a FLU e DES, respectivamente (Figura 2.21).

Tabela 2.6. Tempos de retenção da FLU, DES e CLO utilizando diferentes fases móveis.

Fase móvel	t _R FLU	t _R CLO	t _R DES
ACN:Tampão acetato de amônio 5 mmol L ⁻¹ (50:50)	3,045	3,815	-
ACN:Tampão acetato de amônio 5 mmol L ⁻¹ (50:50)	3,030	3,785	-
ACN:Tampão acetato de amônio 5 mmol L ⁻¹ (50:50)	3,008	-	2,660
ACN:Tampão acetato de amônio 5 mmol L ⁻¹ (50:50)	2,980	-	2,647
ACN:Tampão acetato de amônio 5 mmol L ⁻¹ (40:60)	5,761	7,508	-
ACN:Tampão acetato de amônio 5 mmol L ⁻¹ (40:60)	5,721	7,458	-
ACN:Tampão acetato de amônio 5 mmol L ⁻¹ (40:60)	5,689	-	4,135
ACN:Tampão acetato de amônio 5 mmol L ⁻¹ (40:60)	5,664	-	4,116
Metanol: Tampão acetato de amônio 5 mmol L ⁻¹ (50:50)	24,468	*	-
Metanol: Tampão acetato de amônio 5 mmol L ⁻¹ (50:50)	24.,16	-	15,653
Metanol: Tampão acetato de amônio 5 mmol L ⁻¹ (70:30)	3,310	4,741	-
Metanol: Tampão acetato de amônio 5 mmol L ⁻¹ (70:30)	3,290	4,743	-
Metanol: Tampão acetato de amônio 5 mmol L ⁻¹ (70:30)	3,058	-	2,406
Metanol: Tampão acetato de amônio 5 mmol L ⁻¹ (70:30)	3,248	-	2,416
Metanol: Tampão acetato de amônio 5 mmol L ⁻¹ (60:40)	8,179	12,030	-
Metanol: Tampão acetato de amônio 5 mmol L ⁻¹ (60:40)	8,085	11,811	-
Metanol: Tampão acetato de amônio 5 mmol L ⁻¹ (60:40)	8,002	-	6,445
Metanol: Tampão acetato de amônio 5 mmol L ⁻¹ (60:40)	8,115	-	6,525

*não eluiu após 34 minutos

Figura 2.21. Espectro de massas da FLU e DES, modo SCAN (m/z 100-1000).

4.2.2 Extração e dessorção

Quando se utilizou dessorção com metanol e injeção direta, sem diluição, apareceram picos com ombro, pois o metanol é mais forte que a fase móvel (Figura 2.22).

Figura 2.22. Cromatograma da FLU e DES, com dessorção em metanol e injeção direta.

Dessorção com acetonitrila, e posterior diluição em água, também produziu picos com ombros, pelo mesmo motivo descrito anteriormente.

Dessorção com metanol, e posterior diluição em água (60:40), e com acetato de etila com posterior secagem e diluição em 100 μ L de fase móvel, produziram picos com perfis adequados. Os valores de área foram similares. No entanto, metanol foi escolhido, pois não há necessidade de secagem, um processo tedioso e que pode gerar perdas do analito.

A curva que representa a cinética de extração da FLU e DES está demonstrada na Figura 2.23. O equilíbrio dos analitos entre a fase aquosa e a fase de PDMS foi alcançado em 30 minutos, sendo este o tempo escolhido para a extração.

Figura 2.23. Curva cinética da extração da FLU e DES.

4.2.3 Otimização das condições do detector de massas

A otimização (realizada automaticamente pelo sistema), empregando metanol:tampão acetato de amônio 5 mmol L⁻¹ pH 4,8 (60:40) como fase móvel, encontrou os melhores valores de voltagem do capilar e lentes como sendo 21 V e 5 V, respectivamente.

Estes valores foram, então, fixados variando-se a vazão do gás auxiliar, do gás secante e da temperatura, conforme descrito na Tabela 2.7.

Os melhores resultados (maior relação sinal:ruído) para os parâmetros gás auxiliar, gás de secagem e temperatura foram 80 unidades arbitrárias, 20 unidades arbitrárias e 200 °C, respectivamente. Estes valores foram, então, utilizados nas análises.

Tabela 2.7. Valores de área e relação sinal-ruído obtidos na otimização do detector de massas.

	Área	Relação sinal:ruído
Gás auxiliar (unidades arbitrárias)		
20	56703419	15,6
50	111132509	26,3
80	178369111	40,3
86	151349597	32,4
Gás secante (unidades arbitrárias)		
10	199519566	46,0
20	203438482	48,8
40	184624876	21,0
60	191597129	29,1
Temperatura (°C)		
150	191878653	37,7
200	195301098	49,8
250	197881442	34,5
300	224228112	42,6

4.2.4 Validação

Nenhum pico foi encontrado nos tempos de retenção da FLU (6,0 minutos) ou DES (4,7 minutos) quando o método foi aplicado às amostras de plasma branco de três pacientes diferentes, conforme demonstrado na Figura 2.24.

Figura 2.24. Cromatograma de plasma branco obtido após extração nas condições otimizadas.

Amostras de FLU de 10 ng mL⁻¹ a 500 ng mL⁻¹ e de DES a 100 ng mL⁻¹ foram utilizadas para avaliação da linearidade. Foram preparadas em duplicata, com duas injeções de cada amostra (Tabela 2.8).

Tabela 2.8. Valores de área e DPR usados na avaliação da linearidade.

Concentração (ng mL ⁻¹)	Área		FLU/DES	Média	DPR (%)
	FLU	DES			
10	18220970	159253690	0,1144	0,1146	0,25
10	17009371	148166372	0,1148		
25	74458773	239549721	0,3108	0,2891	10,64
25	72905103	272716210	0,2673		
50	84442624	162784470	0,5187	0,5068	3,32
50	78072985	157757605	0,4949		
100	141270846	162852920	0,8675	0,8593	1,36
100	133894633	157335352	0,8510		
300	290566011	162483955	1,7883	1,7587	2,38
300	224812837	130027669	1,7290		
500	440049798	163747040	2,6874	2,5785	5,98
500	358231500	145062652	2,4695		

Os valores do coeficiente de correlação e a equação da reta foram, respectivamente:

$R^2 = 0,9834$ e $Y = 0,21726 + 0,00488X$., demonstrando que o método possui linearidade adequada. A Figura 2.25 demonstra a curva analítica obtida.

Figura 2.25. Curva analítica obtida na análise de FLU em plasma.

A precisão intra-dia foi avaliada preparando-se cinco amostras de FLU a 500 ng mL⁻¹ e DES a 100 ng mL⁻¹, com duas injeções de cada amostra. O DPR foi de 4,75%, adequado para análises em plasma (Tabela 2.9).

A precisão inter-dias foi avaliada preparando-se outras cinco amostras nas mesmas concentrações anteriores, em outro dia, e calculando-se o DPR das dez amostras (Tabela 2.10).

Tabela 2.9. Valores de área e DPR usados no cálculo da precisão intra-dia.

Área FLU	Área DES	FLU/DES	Média	DPR (%)
430258191	165323797	2,6025	2,6882	4,51
449841383	162170287	2,7739		
372758003	149556325	2,4924	2,4688	1,35
343705002	140568982	2,4451		
494118917	211345053	2,3380	2,3901	3,08
473891014	194039456	2,4422		
454499889	175206041	2,5941	2,6244	1,63
472371331	177941089	2,6547		
442118153	168106732	2,6300	2,5949	1,91
429140640	167648375	2,5598		
			2,5533	4,75

Tabela 2.10. Valores de área e DPR usados no cálculo da precisão inter-dias.

Área FLU	Área DES	FLU/DES	Média	Média (1º dia)
520920713	219194710	2,3765	2,4913	2,6882
544073028	208776181	2,6060		
566922480	245827003	2,3062	2,3864	2,4688
628917620	254984987	2,4665		
488281159	205639748	2,3744	2,3642	2,3901
464173591	197187760	2,3540		
503221020	204822825	2,4569	2,4918	2,6244
494315850	195635229	2,5267		
543808742	202522431	2,6852	2,7159	2,5949
564905625	205674808	2,7466		
			Média (n = 10)	2,5216
			DPR (%)	5,06

O DPR encontrado na avaliação da precisão inter-dias foi de 5,06%, bem inferior ao limite, que é de 15%.

Os resultados encontrados na avaliação da recuperação estão descritos nas Tabelas 2.11 e 2.12.

Tabela 2.11. Valores de área e recuperação encontrados para a FLU.

Concentração (ng mL ⁻¹)	Área FLU obtida com os padrões	Área FLU obtida após extração (média)	Recuperação (%)
10	33607696	17615171	52,41
10	33640931		52,36
100	216571450	137582740	63,53
100	217170170		63,35
500	669189600	399140655	59,65
500	740000633		53,94
Média			57,54
DPR (%)			9,20

Tabela 2.12. Valores de área e recuperação encontrados para a DES.

Concentração (ng mL ⁻¹)	Área DES obtida com os padrões	Área DES obtida após extração (média)	Recuperação (%)
100	268526510	160094145	59,62
100	300793605		53,22
Média			56,42
DPR (%)			8,02

Considerando que os valores de $K_{o/w}$ da FLU e DES e os volumes da fase aquosa e de PDMS são 44668,36; 13489,63; 5 mL e 0,5 mL, respectivamente, os valores de recuperação teóricos deveriam ser 99,5% e 98,5%. No entanto, os valores obtidos estavam em torno de 60%. Essa diferença pode ser devida a duas causas principais. Primeiramente, embora o valor de $K_{o/w}$ seja uma boa aproximação do valor da constante de distribuição PDMS-água, nem sempre isso pode ser considerado verdadeiro. Em segundo lugar, para compostos muito

apolares, com valores de $K_{o/w}$ superiores a 10000 (como é o caso da FLU e DES) pode ocorrer adsorção no vidro e em outras superfícies, diminuindo a recuperação.

Os limites de quantificação e detecção obtidos foram, respectivamente, 10 ng mL^{-1} e 3 ng mL^{-1} . Estes valores permitem a análise de FLU em plasma, considerando que a faixa de concentração em que esse fármaco é encontrado no sangue varia de $50\text{-}500 \text{ ng mL}^{-1}$. A Figura 2.26 apresenta um cromatograma da FLU na concentração de 10 ng mL^{-1} .

A Figura 2.27 apresenta um cromatograma típico da FLU e DES na concentração de 100 ng mL^{-1} .

Figura 2.26. Cromatograma da FLU na concentração de 10 ng mL^{-1} e DES a 100 ng mL^{-1} .

Figura 2.27. Cromatograma típico da FLU e DES na concentração de 100 ng mL^{-1} .

5 CONCLUSÕES

A técnica SBSE se mostrou adequada para a análise de fluoxetina em plasma. O acoplamento desta técnica com a cromatografia gasosa permitiu a obtenção de alta sensibilidade. A reação de derivatização empregando etanol-piridina e cloroformato de etila permitiu a obtenção de picos sem caudas e aumento da extração. O método SBSE-GC-MS desenvolvido apresentou especificidade, linearidade na faixa de 1 ng mL^{-1} a 500 ng mL^{-1} ($R^2 > 0,99$), precisão (DPR $< 15\%$ em todas as concentrações avaliadas) e LOQ e LOD de $30,0 \text{ pg mL}^{-1}$ e $10,0 \text{ pg mL}^{-1}$, respectivamente. O método empregando dessorção térmica também apresentou adequada precisão (DPR $< 17\%$) e LOQ e LOD de $1,37 \text{ pg mL}^{-1}$ e $0,46 \text{ pg mL}^{-1}$, respectivamente. A elevada sensibilidade alcançada com o sistema SBSE-GC-MS com dessorção térmica pode ser muito útil para a análise de fluoxetina na concentração de traços. Embora a dessorção térmica tenha produzido uma sensibilidade mais elevada (cerca de 20 vezes maior) ambos os modos de dessorção possuem adequada sensibilidade para a determinação de fluoxetina em plasma.

O acoplamento SBSE-LC-MS também se mostrou adequado para a análise de fluoxetina em plasma. O método apresentou especificidade, linearidade na faixa de 10 ng mL^{-1} a 500 ng mL^{-1} ($R^2 > 0,98$), precisão (DPR $< 6,0\%$ em todas as concentrações avaliadas) e sensibilidade adequadas para análise nessa matriz (LOQ de 10 ng mL^{-1} e LOD de 3 ng mL^{-1}). A recuperação foi em torno de 60%.

A sensibilidade obtida utilizando a cromatografia gasosa foi bastante superior àquela encontrada para a cromatografia líquida (cerca de 10000 maior quando se utilizou dessorção térmica). Por outro lado, o emprego do sistema SBSE-LC-MS permite a análise sem necessidade de derivatização. O emprego de uma interface que permita a injeção de todo o volume dessorvido (e não apenas uma parte, como foi realizado) no sistema cromatográfico poderia ser um meio para aumentar a sensibilidade do acoplamento SBSE-LC-MS.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BALTUSSEN, H. A. **New concepts in sorption based sample preparation for chromatography**. 2000. 241 f. Tese (Doutorado) – Technische Universiteit Eindhoven, Eindhoven, 2000.
2. BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; CRAMERS, C. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous sample: theory and principles. **J. Microcolumn Sep.**, v. 11, p. 737-747, 1999.
3. TIENPONT, B.; DAVID, F.; DESMET, K.; SANDRA P. Stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary GC-MS applied to biological fluids. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 373, p. 46-55, 2002.
4. 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.**, v. 32, p. 569-579, 2003.
5. TIENPONT, B.; DAVID, F.; STOPFORTH, A.; SANDRA, P. Comprehensive profiling of drugs of abuse in biological fluids by stir-bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry. **LC-GC Europe**, v. 16, p. 2-10, 2003.
6. KAWAGUCHI, M.; SAKUI, N.; OKANOUCHI, 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**, v. 820, p. 49-57, 2005.
7. KAWAGUCHI, M.; INOUE, K.; YOSHIMURA, M.; ITO, R.; SAKUI, N.; OKANOUCHI, 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**, v. 805, p. 41-48, 2004.
8. KAWAGUCHI, M.; INOUE, K.; SAKUI, N.; ITO, R.; IZUMI, S.; MAKINO, T.; OKANOUCHI, N.; NAKAZAWA, H. Stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for the measurement of 4-nonylphenol and 4-*tert*-octylphenol in human biological samples. **J. Chromatogr. B**, v. 799, p. 119-125, 2004.
9. LAMBERT, J. P.; MULLETT, W. M.; KWONG, E.; LUBDA, D. Stir bar sorptive extraction based on restricted access material for the direct extraction of caffeine and metabolites in biological fluids. **J. Chromatogr. A**, v. 1075, p. 43-49, 2005.

10. 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**, v. 533, p. 57-65, 2005.
11. DESMET, K.; TIENPONT B.; SANDRA P. Analysis of 1-hydroxypyrene in urine as PAH exposure marker using in-situ derivatisation stir bar sorptive extraction-thermal desorption - Capillary gas chromatography - Mass spectrometry. **Chromatographia**, v. 57, p. 681-685, 2003.
12. KATAOKA, H. Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis. **J. Chromatogr. A**, v. 733, p. 19-34, 1996.
13. NAKOVICH, Laura. **Analysis of biogenic amines by GC/FID and GC/MS**. 2003. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Virginia Polytechnique Institute and State University, Blacksburg, EUA, 2003.
14. POLSON C.; SARKAR P.; INCLEDON B.; RAGUVARAN V.; GRANT R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. B**, v. 785, p. 263-275, 2003.

3

Determinação de bisfosfonatos

Tenho apenas duas mãos
e o sentimento do mundo (...)
Carlos Drummond de Andrade

3

Determinação de bisfosfonatos

1 INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos (BP's) formam uma classe de substâncias químicas que apresenta uma ligação P-C-P em sua estrutura, e agem como inibidores da reabsorção óssea, mediada pelos osteoclastos. Estes compostos são extensivamente utilizados no tratamento de várias doenças ósseas, destacando-se a doença de Paget, a hipercalcemia maligna, a osteoporose e a doença metastática e osteolítica.

São análogos químicos da substância endógena denominada ácido pirofosfórico (Figura 3.1), que no organismo se encontra como pirofosfato, um inibidor natural da reabsorção óssea. No entanto, essa substância não pode ser utilizada como agente terapêutico no tratamento de doenças ósseas, pois sofre uma rápida hidrólise enzimática. Os bisfosfonatos são seus análogos sintéticos, onde o átomo central de oxigênio é substituído por um de carbono. Essa modificação faz com que os BP's sejam mais resistentes à degradação enzimática, e possuam uma meia-vida biológica maior, suficiente para influenciar o metabolismo ósseo [1].

Figura 3.1. Estrutura química do ácido pirofosfórico.

Diferentes substituintes ligados ao carbono central dão características únicas para cada fármaco (Figura 3.2). O grupo R1 fornece a afinidade dos BP's pelos cristais ósseos, enquanto o grupo R2 é responsável pela potência e atividade farmacológicas [2]. Segundo Shinoda, a adição de um grupo hidroxila ao átomo de carbono na posição 1 aumenta a potência anti-reabsortiva [3]. Derivados com um grupo amino no final da cadeia lateral são extremamente ativos. Além disso, o comprimento da cadeia lateral é também muito importante, sendo a maior atividade encontrada em compostos com quatro carbonos, como o alendronato. Mais recentemente tem sido demonstrado que o grupo amino não tem que estar localizado necessariamente no fim da cadeia. No entanto, ainda não está bem clara a relação existente entre estrutura e atividade, podendo-se dizer apenas que a estrutura P-C-P é fundamental para a atividade e que a intensidade do efeito é intensamente dependente da cadeia lateral.

Figura 3.2. Estrutura química geral dos BP's.

Os BP's são sintetizados por meio de uma grande variedade de rotas sintéticas. Estas levam à produção de BP's com diferentes estruturas químicas e rendimentos.

Os BP's podem ser analisados quantitativa e qualitativamente por um conjunto de técnicas analíticas eficientes. As mais usuais são a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa (GC) e eletroforese capilar (CE), utilizando diferentes detectores, tais como espectrômetro de massas (MS), índice de refração, espectrofotômetro de ultravioleta e eletroquímicos.

1.1 FARMACOLOGIA

1.1.1 Farmacodinâmica

O tecido ósseo contém três tipos de células: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Os osteoblastos formam os ossos por deposição de materiais protéicos na matriz, levando à mineralização. A função dos osteoclastos é a reabsorção óssea. Essas células destroem a matriz sempre que o osso precisa ser remodelado. O terceiro tipo de células, os osteócitos, encontra-se localizado profundamente nas fibras protéicas da matriz óssea estando, provavelmente, envolvidos na homeostase do cálcio plasmático [4].

O mecanismo molecular pelo qual os BP's inibem a reabsorção óssea ainda não é completamente entendido. Inicialmente, acreditava-se que apenas um mecanismo físico-químico, após a adsorção óssea, era suficiente para sua ação [5]. No entanto, ultimamente, tem-se tornado claro que efeitos celulares também estão envolvidos [5]. Como os osteoclastos produzem endocitose, os BP's presentes no espaço onde ocorre a reabsorção podem penetrar nestas células, afetando seu metabolismo intracelular e induzindo apoptose⁵. Recentes estudos têm demonstrado que parte da ação inibitória dos BP's sobre os osteoclastos é mediada por uma atividade dos osteoblastos [6].

Green demonstrou em estudos *in vitro* que os BP's também inibem a proliferação, reduzem a viabilidade e induzem apoptose em muitas células tumorais humanas [7].

As propriedades físico-químicas dos BP's são bem similares entre os membros da série. No entanto, suas atividades anti-reabsortivas diferem grandemente. Por causa dessa grande diferença de potência entre os BP's, suas doses clínicas também diferem acentuadamente [8]. Os principais BP's estudados estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. BP's e suas respectivas potências anti-reabsortivas relativas em modelos *in vivo*.

Bisfosfonato	R1	R2	Potência
Clodronato	Cl	Cl	~10
Etidronato	OH	CH ₃	~1
Pamidronato	OH	(CH ₂) ₂ NH ₂	~100
Alendronato	OH	(CH ₂) ₃ NH ₂	>100-<1000
Neridronato	OH	(CH ₂) ₅ NH ₂	~100
Olapadronato	OH	(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	>100-<1000
Ibandronato	OH	(CH ₂) ₂ N(CH ₃)(CH ₂) ₄ CH ₃	>1000-<10000
Risedronato	OH	CH ₂ -3-piridina	>1000-<10000
Zoledronato	OH	CH ₂ -imidazol	>10000

Os BP's tornaram-se uma alternativa para o tratamento de uma variedade de doenças ósseas onde há uma excessiva atividade dos osteoclastos, incluindo doença de Paget, hipercalcemia maligna, osteoporose e doença metastática e osteolítica [9]. São também úteis em muitas formas de osteoporose secundária, causadas por utilização de glicocorticóides, gravidez, transplante de órgãos e paraplegia [1].

Altas doses de muitos BP's podem dificultar a mineralização normal dos ossos [10]. Dessa forma, busca-se atualmente o desenvolvimento de BP's com alta atividade anti-reabsortiva, que tenham uma ampla faixa de segurança para a mineralização normal.

O *Trypanosoma cruzi* (protozoário causador da doença de Chagas) contém importantes depósitos de pirofosfato e polifosfatos em organelas denominadas acidocalcisomas. Estudos recentes mostram que os BP's inibem o crescimento do protozoário *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo*, por meio da competição com o pirofosfato em sua via metabólica, sem causar toxicidade nas células hospedeiras [11].

Martin *et al.* verificaram a ação dos BP's que possuem nitrogênio na cadeia lateral, sobre o crescimento dos parasitas *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum* [12]. O mecanismo de ação dos BP's

consiste, basicamente, na inibição da formação de proteínas de importância vital para os parasitas.

A artrite reumatóide está relacionada com uma erosão óssea nas articulações. Alguns estudos clínicos têm sido realizados para avaliar a eficiência de agentes anti-artríticos; recentemente, a família dos BP's vem obtendo destaque no tratamento dessa doença [13]. Os ésteres dos BP's têm conseguido diminuir, significativamente, as inflamações associadas com a formação do granuloma cutâneo e com a artrite erosiva, inibindo a erosão óssea nas articulações [13,14].

Devido à sua capacidade quelante, os bisfosfonatos também têm sido estudados para elaboração de novos medicamentos capazes de controlar a quantidade de íons ferro e alumínio no organismo humano [15]. Recentemente novos BP's foram sintetizados por meio das reações de Michaelis-Arbuzov, Michaelis-Becker e transesterificação do fosfonoacetato de trietila. Estas metodologias foram satisfatórias, tendo em vista o bom rendimento obtido e a facilidade de execução. Estes bisfosfonatos mostraram-se eficientes agentes quelantes frente a diferentes metais [16].

Estudos realizados com etidronato e clodronato demonstraram que estes fármacos apresentam baixa toxicidade. Testes realizados em diferentes espécies animais indicaram não serem teratogênicos, mitogênicos ou carcinogênicos [17].

De maneira geral, os BP's apresentam poucos efeitos adversos. O etidronato pode causar inibição na mineralização normal dos ossos, originando fraturas [18]. Distúrbios gastrintestinais e alterações no paladar também podem ocorrer [19]. Para o clodronato, apenas alguns poucos casos de diarreia branda foram relatados [20]. Pamidronato pode causar distúrbios gastrintestinais tais como náusea, vômito e diarreia. Após a administração oral ou intravenosa, pode induzir pirexia de 1 a 2 °C [21].

1.1.2 Farmacocinética

A biodisponibilidade oral, fração de uma dose que alcança a circulação sistêmica, é determinada pela comparação da área total sob a curva de concentração no plasma *versus* tempo, após a administração oral e intravenosa [22].

Os BP's apresentam baixa absorção intestinal em humanos, com biodisponibilidade de cerca de 0,7% para alendronato, 0,3% para pamidronato, 3-7% para etidronato e 1-2% para clodronato [8]. Esta baixa absorção ocorre porque estes fármacos são pouco lipofílicos, dificultando o transporte através da barreira epitelial [23]. Além do mais, são moléculas relativamente grandes, negativamente carregadas no pH intestinal e complexam facilmente com o cálcio, prejudicando ainda mais a sua absorção [24]. Os alimentos causam uma acentuada diminuição na absorção dos BP's, devendo ser administrados pelo menos 30 minutos antes da primeira alimentação diária [25].

Estudos realizados em ratos, com o alendronato, demonstraram que ele possui forte interação com as proteínas plasmáticas, principalmente a albumina sérica. O aumento do pH e da concentração de íons cálcio acentua ainda mais essa interação [26].

Após a administração intravenosa, o alendronato é amplamente distribuído por todo o corpo, incluindo os tecidos calcificados e não calcificados. Os BP's ligam-se preferencialmente em ossos com alta taxa de remodelagem, devido à grande exposição da hidroxiapatita nesses sítios [8].

Não foram encontradas evidências de metabólitos dos BP's nos estudos realizados, indicando serem muito estáveis. Essa característica minimiza a toxicidade do tratamento, devido à ausência de intermediários reativos e metabólitos tóxicos [27].

A excreção renal é a única rota de eliminação dos BP's. Estudos realizados em animais e humanos indicam que os BP's administrados sistemicamente são parcialmente

ligados aos tecidos ósseos e o restante é excretado pelos rins. Após a administração intravenosa, os BP's desaparecem do plasma rapidamente, com uma meia-vida de 1-2 h. Por outro lado, uma vez ligado ao osso, eles só são liberados quando o tecido ósseo, ao qual estão ligados, sofre reabsorção [8].

1.2 SÍNTESE

O primeiro bisfosfonato utilizado no tratamento de doenças ósseas foi o etidronato, o qual pode ser facilmente sintetizado por meio de reação entre anidrido acético e ácido fosforoso (Esquema 3.1) [28].

Esquema 3.1. Síntese do etidronato.

Estudos posteriores demonstraram que os BP's que possuem um átomo de nitrogênio em sua cadeia lateral possuem potência superior ao etidronato [29]. Mais recentemente, foi demonstrado que o grupo amino não deve estar, necessariamente, no final da cadeia. A atividade é aumentada quando um grupo metil e um pentil são ligados ao nitrogênio [30].

A reação mais comum utilizada na preparação desses BP's é entre um ácido carboxílico e o ácido fosforoso, na presença de tricloreto de fósforo (Esquema 3.2) [30]. Vários tipos de BP's são obtidos a partir de diversos ácidos carboxílicos, com bons rendimentos (Tabela 3.2). Os reagentes são deixados sob agitação a 65 °C por aproximadamente 18 h, utilizando como solvente o ácido metanossulfônico ou

benzenossulfônico. Logo após, é adicionado hidróxido de sódio para ocorrer a precipitação dos sais de BP's.

Esquema 3.2. Reação entre ácido carboxílico e ácido fosforoso na presença de tricloreto de fósforo.

Tabela 3.2. Valores típicos de rendimento da síntese dos BP's para diferentes ácidos carboxílicos.

R	n	R%
NH ₂	2	57
NH ₂	3	89
NH ₂	4	78
NH ₂	5	89
CH ₃	10	95
3-imidazol	1	31
3-piridil	1	38
4-aminofenil	1	26
Cl	3	30

Esta síntese também pode ser realizada utilizando-se ácidos graxos de cadeia pequena e que não contenham nitrogênio (Esquema 3.3). Os BP's assim formados mostraram-se ativos contra o crescimento do *Trypanosoma cruzi* [11].

Outra rota de síntese mais moderna é realizada pela reação entre um cloreto de acila e o tris(trimetilsilil)fosfito, com posterior metanólise [31].

Esquema 3.3. Síntese de BP's a partir de ácidos graxos de cadeia pequena ($n = 1, 2, 3$ e 4).

A reação do cloreto de acila com 2 equivalentes de tris(trimetilsilil)fosfito leva, em poucos minutos e com temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, à formação do éster tetrakis(trimetilsilil) do ácido 1-trimetilsiloxi-1,1-bifosfônico. Logo após, ocorre a metanólise durante 1 h à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os BP's são obtidos com a evaporação da fração volátil (Esquema 3.4).

Esquema 3.4. Síntese de BP's por meio da reação entre o cloreto de acila e o tris(trimetilsilil)fosfito.

Esta reação possui inúmeras vantagens quando comparada à reação mencionada anteriormente, destacando-se: condições mais brandas do sistema reacional, maiores rendimentos obtidos e menores tempos de reação. Por outro lado, observam-se algumas desvantagens: alto preço do reagente tris(trimetilsilil)fosfito e dificuldade de se encontrar comercialmente diferentes cloretos de acila (sendo necessária a preparação dos mesmos) [31].

A preparação de cloretos de acila é bastante conhecida na literatura e consiste na reação entre um ácido carboxílico e o cloreto de tionila (Esquema 3.5) [32]. Entretanto, isso representa uma nova etapa na síntese dos BP's, acarretando, principalmente, redução do rendimento total.

Esquema 3.5. Síntese de cloretos de acila.

Outro método de preparo dos BP's consiste na reação de bishidrofosforilação de alcinos terminais por fosfitos de dialquila, catalisada por paládio [33]. Os alcinos terminais são sintetizados por uma reação de Heck entre um haleto de arila e o trimetilsililacetileno, com a remoção do grupo trimetilsilil em condições básicas (Esquema 3.6a). Os fosfitos de dialquila, por sua vez, são sintetizados pela reação entre um equivalente de tricloreto de fósforo e três equivalentes do álcool correspondente (Esquema 3.6b) [34]. Refluxando a mistura contendo um equivalente do alcino terminal e três equivalentes de fosfito de dialquila, na presença de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ e tolueno (solvente), obtém-se uma grande variedade de BP's vicinais com ótimos rendimentos (Esquema 3.6c) [33].

Esquema 3.6. Síntese de BP's através de uma reação de bis-hidrofosforilação catalisada por paládio: (a) síntese do alcino terminal; (b) síntese do fosfito de dialquila; (c) reação do alcino terminal com fosfito de dialquila.

Outros tipos de BP's podem ser preparados utilizando os íons enolato como intermediários. O tratamento de compostos carbonílicos com uma base forte e posterior adição de excesso de grupos eletrofílicos $[CIP(OEt)_2]$ resulta na formação de duas ligações P-C no carbono α . Estes BP's são obtidos após oxidação com peróxido de hidrogênio [35]. O Esquema 3.7 ilustra uma reação realizada nestas condições.

Esquema 3.7. Síntese de BP's utilizando íons enolato como intermediários.

Na Tabela 3.3 são mostrados outros exemplos de produtos formados a partir de diferentes substratos [35].

Tabela 3.3. BP's obtidos a partir de diferentes lactamas e compostos carbonílicos.

Reagentes	Produtos	Rendimento (%)
		77
		67
$(CH_3CH_2)_2N-C(=O)-CH_3$		72
<p>$R =$ </p>		

BP's derivados de α -aminoácidos foram sintetizados, demonstrando também atividade anti-reabsortiva [36]. Nesta reação é feita, inicialmente, a proteção do grupo amina do aminoácido, seguida de substituição do grupo hidroxila pelo cloro. Posteriormente, é feita a inserção dos átomos de fósforo em duas etapas. Primeiramente, ocorre reação com um reagente adequado de fósforo, formando um fosfonato de acila e, em seguida, ocorre ataque de um segundo átomo de fósforo, formando o bisfosfonato. Finalmente, o grupo protetor é retirado, os grupos ésteres são hidrolisados e os BP's são obtidos como sais de sódio (Esquema 3.8) [36].

Esquema 3.8. Síntese de BP's derivados de α -aminoácidos.

Como descrito anteriormente, a estrutura da cadeia lateral, bem como a presença ou não de heteroátomo fornece características bem distintas aos BP's. O 2-aminociclopropilideno-1,1-bisfosfonato de tetraetila, ainda não avaliado clinicamente, possui anel de 3 membros em sua cadeia lateral, podendo proporcionar uma atividade farmacológica ainda não encontrada em outros BP's [37].

A síntese deste composto é realizada em três passos (Esquema 3.9). Primeiramente, o lítio-carbânion do 2-bromoacetato de etila é adicionado, via adição de Michael, ao vinilideno 1,1-bisfosfonato de tetraetila. Essa adição é seguida de uma ciclização intramolecular levando

à formação de um derivado ciclopropil. Posteriormente, este derivado é saponificado, e o ácido obtido é convertido em uma amina [37].

Esquema 3.9. Síntese do 2-aminociclopropilideno-1,1-bisfosfonato de tetraetila.

1.3 ANÁLISE

Os BP's podem ser analisados por várias técnicas analíticas, destacando-se a cromatografia gasosa, a cromatografia líquida de alta eficiência e a eletroforese capilar. Estas técnicas são utilizadas para a determinação de BP's na matéria-prima, no produto acabado, e em fluidos biológicos, sendo neste caso necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas com alta sensibilidade, tendo em vista a baixa concentração destes fármacos neste meio.

A análise em meio biológico requer, muitas vezes, a utilização de técnicas de pré-concentração, tais como microextração em fase sólida (SPME) e extração em fase sólida (SPE), sendo esta última a mais comum.

O desenvolvimento de métodos sensíveis é dificultado pelas características das moléculas dos BP's mais utilizados. Estes não possuem grupos cromóforos e não podem ser determinados pelos detectores mais usuais (ultravioleta e fluorescência). Para contornar esta dificuldade têm sido desenvolvidos métodos de derivação e detecção indireta. Entretanto, estes métodos requerem maior tempo para sua execução, além de serem mais passíveis de erros.

Nos últimos anos tem-se observado um aumento no desenvolvimento de métodos que utilizam a espectrometria de massas. Este detector possui a grande vantagem de ser seletivo e universal, além de possuir boa sensibilidade e robustez. Além disso, permite a análise direta, sem necessidade de derivação. Por outro lado, é uma técnica mais cara e que exige maior experiência por parte dos analistas.

1.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Esta técnica é a mais utilizada para análise dos BP's, sendo empregados diferentes detectores, fases móveis e mecanismos de retenção.

Chester desenvolveu um detector seletivo para fósforo, baseado na emissão molecular de luz pelo HPO, para HPLC, analisando diversos ácidos fosfônicos [38]. Posteriormente, o mesmo autor utilizou esse detector para análise do clodronato em fluidos biológicos [39]. O mecanismo de separação empregado foi de troca aniônica, obtendo-se um limite de quantificação de $2 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Foram relatados vários métodos utilizando detecção por índice de refração. Um método para determinação do ácido metilenobisfosfônico, utilizando pareamento iônico, foi desenvolvido por Yeh [40]. Foi utilizada uma coluna convencional C18 e o composto tri-*n*-octilamina como agente de pareamento iônico. Wong *et al.* desenvolveram um método

empregando coluna de troca aniônica, para análise de diferentes polifosfonatos, obtendo limites de detecção de 2,4 a 15,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [41]. Han *et al* analisaram comprimidos de alendronato sódico utilizando coluna de troca aniônica. Este método mostrou-se exato, específico, robusto e com limite de detecção adequado para análises de rotina de comprimidos [42].

A análise de BP's utilizando detectores de fluorescência também é muito utilizada. Como estas moléculas, em geral, não possuem grupos que fluorescem, são necessárias algumas estratégias para a utilização de tais detectores. Derivatizações pré ou pós-coluna e detecção indireta são as mais utilizadas. No primeiro caso, uma molécula fluorescente é ligada ao BP, enquanto na detecção indireta o composto fluorescente encontra-se presente na fase móvel.

Métodos de determinação indireta de BP's foram desenvolvidos utilizando o complexo de alta fluorescência formado entre o alumínio e o morin (2',3',4',5,7-pentidroxiflavona). Na presença dos BP's o alumínio liga-se a estes compostos formando um complexo mais estável e que não fluoresce. A passagem do complexo alumínio-morin pelo detector de fluorescência gera absorção ao passo que o complexo BP-alumínio, ao passar pelo detector, causa diminuição da absorção, registrando um pico negativo [43,44]. A detecção por fluorescência com derivatização pós-coluna foi descrita por Kwong *et al.* para a análise de comprimidos de alendronato. Foram utilizados os compostos *o*-ftalaldeído e mercaptoetanol (OPA-MERC) como reagente pós-coluna. Foi utilizada uma coluna de fase reversa com pareamento iônico [45].

Vários compostos podem ser utilizados para a derivatização pré-coluna na detecção por fluorescência. O pamidronato foi determinado em urina, empregando a fluorescamina como reagente de fluorescência e coluna de fase reversa (C18) [46]. Os limites de quantificação e detecção obtidos foram de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 50 nmol L^{-1} . Posteriormente, foram

alcançados melhores limites de quantificação e detecção ($0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 10 nmol L^{-1} , respectivamente), aprimorando-se o processo de extração dos analitos [47].

O composto 2,3-naftaleno dicarboxaldeído também é utilizado em derivatizações pré-coluna. Kline *et al.* determinaram o alendronato em urina utilizando este reagente, na presença do íon cianeto, e coluna de fase reversa polimérica. Foi obtido limite de quantificação de 5 ng mL^{-1} [48]. Este método foi melhorado substituindo-se o íon cianeto pelo composto N-acetil-D-penicilamina, obtendo-se um limite de quantificação de 1 ng mL^{-1} [49].

Outra opção para a derivatização pré-coluna é a utilização do reagente 1-naftilisotiocianato, para a determinação do pamidronato em fluidos biológicos. Para tanto, a separação foi feita por meio de pareamento iônico [50-52].

Para a determinação de BP's utilizando detectores de ultravioleta (UV) são também necessárias estratégias, devido à ausência de grupos cromóforos nestes fármacos. Sparidans *et al.* desenvolveram um método para a análise de oito diferentes BP's, onde estes são complexados "in-line" com íons cobre(II), absorvendo no UV em 245 nm. Utilizou-se coluna de troca aniônica e fase móvel constituída de ácido nítrico $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e nitrato de cobre(II) $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. O limite de detecção obtido foi de $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ [53].

Foram também desenvolvidos métodos utilizando derivatizações pré-coluna. De Marco *et al.* determinaram o alendronato empregando o composto cloroformato de 9-fluorenilmetil (FMOC), na presença de citrato de sódio, como reagente de derivatização. Utilizou-se coluna de fase reversa polimérica, com detecção em 266 nm [54]. Outro método foi desenvolvido utilizando o isotiocianato de fenila seguido de tratamento com peróxido de hidrogênio, antes da injeção [55]. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A análise de BP's com detecção no UV-Visível e derivação póscoluna é muito utilizada. Daley-Yates *et al.* desenvolveram um método para análise em plasma e urina [56].

Os BP's foram oxidados a ortofosfato com persulfato de amônio e posterior reação com molibdênio-ascorbato, formando o cromóforo fosfomolibdato, detectado em 820 nm. Obteve-se limite de detecção de 10 ng mL^{-1} .

Foi desenvolvido outro método para análise de clodronato, empregando coluna de poliestireno-divinilbenzeno. O analito foi detectado em 300 nm após reação com solução ácida de ferro (III) [57]. Foram propostos métodos utilizando o complexo tório-EDTA-laranja de xilenol. Os BP's reagem quantitativamente com este complexo em condições levemente ácidas [58,59].

Outra alternativa para a detecção no UV são os métodos indiretos. Tsai *et al.* propuseram um método para análise de comprimidos de etidronato utilizando ácido nítrico (absorção máxima em 220 nm) como eluente. Os cromatogramas obtidos apresentam uma queda no sinal quando ocorre a passagem dos BP's pela célula do detector [60].

Detectores eletroquímicos também podem ser utilizados na determinação de BP's, com a vantagem de não haver necessidade de derivação do analito. Entretanto, estes detectores são muito sensíveis a variações externas, o que compromete a reprodução dos resultados. Usui *et al.* propuseram um método para análise de um novo BP, extraído de plasma, urina e osso, empregando detector eletroquímico operando no modo oxidativo. Foram obtidos limites de quantificação de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ no plasma, 1 ng mL^{-1} na urina e 25 ng g^{-1} no osso [61].

Detectores condutimétricos são utilizados na determinação de diferentes BP's, também sem a necessidade de derivatização do analito. São empregadas colunas de troca aniônica [62-64].

Qin *et al.* desenvolveram método para a determinação de alendronato (altamente polar e termolábil) em comprimidos utilizando cromatografia iônica acoplada a detector de massas,

empregando interface do tipo íon-spray, operando no modo negativo. Observou-se neste estudo que a fragmentação dominante deste composto é a clivagem das ligações C-P [65].

O clodronato e BP's relacionados foram analisados por espectrometria de massas com fonte de ionização por eletrospray no modo negativo, em um equipamento do tipo triplo quadrupolo. Foram propostos diferentes caminhos para a fragmentação destes compostos e avaliada a influência do pH no grau de desprotonação [66].

1.3.2 Cromatografia Gasosa

Os BP's possuem natureza polar e baixa volatilidade. Desta forma, para análise por cromatografia gasosa, é necessário o processo de derivatização para a formação de compostos voláteis e estáveis. Comprimidos de etidronato foram analisados por meio da derivatização com bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida. Utilizou-se detector de ionização de chama para análise e detector de massas para controle do derivado formado. O método mostrou-se rápido e específico, porém sem sensibilidade suficiente para análise deste fármaco em fluidos biológicos [67].

Auriola *et al.* descreveram um método para análise de clodronato em urina. O analito extraído reagiu com um derivado trimetilsilil e foi analisado utilizando detector de massas [68].

Foi desenvolvida metodologia para análise de diferentes BP's nitrogenados, utilizando o composto cloroformato de isobutila como reagente de derivatização. Utilizou-se detector fotométrico de chama, obtendo-se limite de detecção no plasma de 200 ng mL⁻¹. Realizou-se também análise com espectrômetro de massas para confirmação estrutural dos derivados formados [69].

1.3.3 Eletroforese Capilar

Isotacoforese capilar foi utilizada para análise de pamidronato e impurezas de síntese e degradação presentes. Foram comparados dois sistemas com diferentes condições e estes se mostraram adequados para análises de rotina [70].

Um método para análise de alendronato em formulações farmacêuticas foi descrito por Tsai *et al.* [71]. Utilizou-se detecção direta no UV baseada na formação “on-line” de complexo cromóforo entre este fármaco e os íons cobre(II) presentes na solução eletrolítica. No entanto, este método não pode ser utilizado para análise de soluções intravenosas devido à presença dos ânions citrato (forte agente quelante) em suas formulações.

Sirén *et al.* desenvolveram método para análise de BP's, com detecção indireta no UV, utilizando corantes nitrosonaftóis sulfonatados na solução eletrolítica. O limite de detecção obtido foi de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 254 nm [72].

Peng *et al.* determinaram o BP 2-tioetano-1,1-ácido bisfosfônico utilizando método com determinação direta no UV, coluna revestida com glicerol, fosfato em alta concentração como tampão e injeção eletrocínica sob condições de “sample stacking”. O limite de detecção foi de 50 ng mL^{-1} [73].

Um método para determinação de clodronato e suas impurezas, utilizando detecção de massas por eletrospray e modo negativo, foi desenvolvido por Huikko *et al.* [74]. Este mostrou alta capacidade de separação e especificidade para análise de BP's.

Um método com detecção direta no UV em baixo comprimento de onda e polaridade invertida foi aplicado para separação e quantificação de impurezas em clodronato. Utilizou-se capilar de poliacrilamida e avaliou-se a influência do pH e força iônica do eletrólito sobre a separação [75].

1.3.4 Outros métodos

Reed *et al.* descreveram um método direto para análise de alendronato em comprimidos. As amostras foram dissolvidas em água e o conteúdo de fósforo foi analisado por plasma acoplado indutivamente (ICP). O método apresentou boa precisão e exatidão [76].

Recentemente, alguns métodos empregando ICP e detecção por espalhamento de luz (*evaporative light scattering*) têm sido descritos na literatura [77-79]. No entanto, estes detectores não são comuns em laboratórios analíticos.

A formação de complexo entre alendronato e cloreto férrico em solução de ácido perclórico foi estudada e analisada por espectrofotometria. Este método apresentou limite de detecção de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$, suficiente para análise nas formulações farmacêuticas [80].

2 OBJETIVOS

- Desenvolver métodos alternativos para análises de rotina dos fármacos etidronato, clodronato, pamidronato e alendronato em matéria-prima e produto acabado, empregando cromatografia iônica e detecção no ultravioleta.
- Empregar colunas de diâmetro interno reduzido (2,0 mm), diminuindo o consumo de solventes. Além disso, utilizar colunas de sílica, mais baratas que as poliméricas utilizadas em estudos prévios.
- Validar os métodos desenvolvidos, avaliando os parâmetros precisão, exatidão, especificidade, limites de quantificação e detecção, linearidade, faixa de trabalho e robustez de acordo com as normas da International Conference on Harmonization (ICH).

- Desenvolver método para a determinação de BP's em fluidos biológicos empregando o acoplamento LC-MS.
- Otimizar as condições cromatográficas e de espectrometria de massas do método desenvolvido empregando planejamento fatorial.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 PADRÕES E REAGENTES

O padrão de clodronato foi obtido da Sigma-Aldrich Chemical Co. (Steinheim, Alemanha) e os padrões de alendronato, pamidronato e etidronato foram gentilmente cedidos por Fagron Pharmaceuticals B.V (Uitgeest, Holanda). As soluções utilizadas nas análises foram preparadas utilizando água purificada em um sistema Milli-Q Ultra-Pure Water System (Millipore, Bedford, EUA).

Para a determinação de alendronato foram utilizados medicamentos de 2 diferentes laboratórios: Fosamax (Merck Sharp & Dome, México), contendo os excipientes celulose microcristalina, croscarmelose sódica, lactose anidra e estearato de magnésio, denominado referência e Alendronato Sódico (Teva, Israel), contendo os excipientes hidroxipropilcelulose, hidroxipropilcelulose de baixa substituição, sílica hidratada e estearil fumarato de sódio, denominado genérico. Os medicamentos foram adquiridos no comércio e estavam na forma de comprimidos contendo o equivalente a 10 mg de ácido alendrônico.

Utilizou-se ainda, ácido nítrico e cloreto férrico Carlo Erba (Milão, Itália), nitrato de cobre II FBDE, ácido cítrico Merck (Rio de Janeiro, Brasil), citrato de sódio diidratado, ácido fórmico e hidróxido de amônio Mallinckrodt (Xalostoc, México) grau analítico.

3.2 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica Mettler Toledo (modelo AG285).
- Agitador magnético VWR Scientific Products
- Sistema de purificação de água Milli-Q Synthesis MILLIPORE
- Potenciômetro Micronal (modelo B-374).
- Cromatógrafo líquido Shimadzu (série LC-10A), equipado com duas bombas (modelo LC-10Ai), forno para coluna (modelo CTO-10ASVP), detector UV-Visível de comprimento de onda fixo (SPD-10AVP), amostrador automático (modelo SIL-10Ai), controlador de sistema (modelo SCL-10AVP), desgaseificador (modelo DGU14A) e software de aquisição de dados Class-VP.
- Cromatógrafo líquido Shimadzu (série LC-10A), equipado com duas bombas (modelo LC-10Ai), forno para coluna (modelo CTO-10ACVP), detector de arranjo de fotodiodos (SPD-M10AVP), controlador de sistema (modelo SCL-10AVP), desgaseificador (modelo DGU2A) e software de aquisição de dados Class-VP.
- Bombas LC-10ADVP e LC-10AD Shimadzu (Kyoto, Japão).
- Forno para coluna TCM 008472 Waters (Milford, EUA)
- Espectrômetro de massas modelo Platform LC, Micromass (Manchester, Inglaterra), software de aquisição de dados Masslynx.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Cromatografia iônica com complexação in-line com íons cobre

Foi utilizada coluna Alltech de troca aniônica (SAX) 250 x 4,6 mm, 5 μm e fase móvel constituída de ácido nítrico 1,5 mmol L^{-1} e nitrato de cobre II 0,5 mmol L^{-1} em água. O fluxo foi de 1,0 mL min^{-1} , o volume injetado foi de 20 μL e a temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$. Avaliaram-se os cromatogramas em quatro diferentes comprimentos de onda: 220, 230, 240 e 250 nm. As amostras de clodronato foram preparadas nas concentrações de 1 mg mL^{-1} , 0,1 mg mL^{-1} e 0,01 mg mL^{-1} .

As concentrações de ácido nítrico e de nitrato de cobre II foram, em seguida, modificadas para 2 mmol L^{-1} , objetivando reduzir o tempo de retenção.

Posteriormente, preparou-se fase móvel constituída de ácido nítrico 2 mmol L^{-1} e amostra contendo clodronato (0,1017 mg mL^{-1}) e nitrato de cobre II (0,3751 mg mL^{-1}), nas mesmas condições anteriores, com o objetivo de melhorar o perfil dos picos.

A seguir, foi preparada solução contendo 0,2018 mg mL^{-1} de clodronato e 0,7502 mg mL^{-1} de nitrato de cobre II e o fluxo foi aumentado para 1,2 mL min^{-1} objetivando aumentar a área do pico e diminuir o tempo de retenção.

3.3.2 Cromatografia iônica com complexação in-line com íons ferro

Inicialmente, foram obtidos espectros no ultravioleta da solução da fase móvel constituída de ácido nítrico e cloreto férrico e da solução de clodronato na fase móvel para escolha do melhor comprimento de onda para detecção. Posteriormente, foi avaliada a melhor concentração do ácido nítrico na fase móvel, objetivando encontrar um valor de pH adequado

à análise do clodronato, considerando seus valores de pKa (1; 2; 6 e 9,5) e sua interação com a fase estacionária.

A coluna utilizada foi Alltech SAX 250 x 4,6 mm, 5 μm . A fase móvel era constituída de ácido nítrico 2,0 mmol L⁻¹ e cloreto férrico 0,107 mmol L⁻¹, com fluxo de 1,0 mL min⁻¹. O volume injetado foi de 20 μL e o comprimento de onda utilizado foi de 240 nm. A amostra do padrão de clodronato foi preparada na concentração de 0,2024 mg mL⁻¹ em fase móvel.

3.3.3 Cromatografia iônica com detecção indireta no ultravioleta

3.3.3.1 Testes iniciais e otimização

Foram desenvolvidas diferentes metodologias para a análise dos bisfosfonatos alendronato, pamidronato, clodronato e etidronato por cromatografia de troca iônica e detecção indireta no ultravioleta. Cada um destes fármacos apresenta comportamento específico nos sistemas de troca iônica sendo, por isso, necessário o desenvolvimento de diferentes métodos para cada composto. Objetivou-se, com isso, desenvolver métodos simples, rápidos e baratos (empregando colunas de sílica no lugar das poliméricas) para a análise rotineira de controle de qualidade de bisfosfonatos em matéria-prima e produto acabado.

3.3.3.1.1 Alendronato

Inicialmente, buscou-se reproduzir alguns métodos descritos na literatura para a análise de alendronato utilizando colunas de troca aniônica e fase móvel constituída de solução de ácido nítrico.

As condições utilizadas foram as seguintes: coluna Phenomenex Phenosphere SAX 150 x 4,6 mm, 5 μm , ácido nítrico como fase móvel (concentração variando de 0,01 mmol L^{-1} a 3,16 mmol L^{-1}), fluxo de 1,0 mL min^{-1} , temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$, injeção de 20 μL e comprimento de onda de 220 nm. Foram utilizadas amostras de alendronato na concentração de 101,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Posteriormente, aumentou-se a temperatura para 40 $^{\circ}\text{C}$ e, em seguida, para 50 $^{\circ}\text{C}$, para verificar se havia algum efeito sobre a retenção.

A seguir, foi utilizada solução de ácido cítrico 15,85 mmol L^{-1} :água em diferentes proporções para avaliar se o alendronato eluía da coluna cromatográfica. As outras condições utilizadas foram: coluna Phenomenex Phenosphere SAX 150 x 4,6 mm, 5 μm , fluxo de 1,0 mL min^{-1} , temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$, injeção de 20 μL e comprimento de onda de 220 nm. Utilizou-se solução de alendronato na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Em seguida, foi preparado tampão citrato de sódio 10 mmol L^{-1} em diferentes pH's, variando-se as proporções de ácido cítrico e citrato (Tabela 3.4). Foram preparados, também, tampões nas concentrações de 18 mmol L^{-1} , 20 mmol L^{-1} , 25 mmol L^{-1} e 30 mmol L^{-1} , em diferentes pH's (3,0 a 7,0), buscando-se encontrar uma concentração que gerasse boa resposta aliada a uma boa separação. As outras condições cromatográficas foram as mesmas utilizadas com a fase móvel constituída de ácido cítrico 15,85 mmol L^{-1} :água.

Tabela 3.4. Composição do tampão citrato de sódio em diferentes pH's.

pH desejado	% de ácido cítrico 10 mmol L^{-1}	% de citrato de sódio 10 mmol L^{-1}
7,0	1,5	98,5
6,0	19	81
5,0	41	59
4,8	46	54
4,6	51	49
4,4	56	44
4,2	63	37
4,0	66	34

3.3.3.1.2 Pamidronato

O pamidronato possui uma estrutura molecular muito parecida com a do alendronato, diferindo deste em apenas um grupo metila. Assim, após os testes realizados com o alendronato, foi verificado se o pamidronato se comportava de forma parecida no método desenvolvido utilizando tampão citrato 30 mmol L⁻¹ em diferentes pH's como fase móvel e coluna Phenomenex Phenosphere 150 x 4,6 mm, 5 µm. Foi utilizada solução de pamidronato na concentração de 863,0 µg mL⁻¹.

Foi também testado método utilizando fase móvel constituída de ácido nítrico 1 mmol L⁻¹ (A):nitrato de sódio 100 mmol L⁻¹ (B) em diferentes proporções, conforme a Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Composição de fase móvel constituída de ácido nítrico:nitrato de sódio em diferentes proporções e diferentes valores de pH.

% A	% B	[NO ₃ ⁻] total (mol L ⁻¹)	pH
100	0	1,0 x 10 ⁻³	3,00
90	10	10,9 x 10 ⁻³	3,05
80	20	20,8	3,10
70	30	30,7	3,15
60	40	40,6	3,22
50	50	50,5	3,30
40	60	60,4	3,40
30	70	70,3	3,52
20	80	80,2	3,70
10	90	90,1	4,00
0	100	100,0	6,04

3.3.3.1.3 Etidronato

Foi testado, inicialmente, ácido nítrico em diferentes concentrações (0,01 mmol L⁻¹ a 3,16 mmol L⁻¹) como fase móvel. Avaliou-se, também o efeito do aumento de temperatura na separação. As outras condições utilizadas foram: coluna Phenomenex Phenosphere SAX

150 x 4,6 mm, 5 μm , fluxo de 1,0 mL min^{-1} , temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$, injeção de 20 μL e comprimento de onda de 220 nm.

Posteriormente, foi utilizado ácido nítrico 15,85 mmol L^{-1} :água em diferentes proporções, como fase móvel. As outras condições cromatográficas foram as mesmas dos testes iniciais.

Em seguida testou-se tampão citrato 30 mmol L^{-1} em diferentes valores de pH (de 3,0 a 7,0) para avaliar se ocorria boa separação. Foi testado também tampão citrato 20 mmol L^{-1} em diferentes valores de pH para avaliar em que concentração de tampão o etidronato apresentava melhor resposta (maior valor de altura do pico). Utilizando detecção indireta no ultravioleta a concentração do tampão interfere na resposta pois quanto maior for a diferença de absorção entre a fase móvel e o analito maior será a área obtida. Foram comparados também diferentes comprimentos de onda objetivando-se encontrar aquele onde a resposta era maior.

3.3.3.1.4 Clodronato

Inicialmente, foi utilizado tampão citrato 30 mmol L^{-1} em diferentes valores de pH para verificar como ocorria a separação. As outras condições cromatográficas foram: coluna Phenomenex Phenosphere SAX 150 x 4,6 mm, 5 μm , fluxo de 1,0 mL min^{-1} , temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$, injeção de 20 μL e comprimento de onda de 220 nm. Foi utilizada solução de clodronato na concentração de 838 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Em seguida, foram preparadas diferentes soluções de tampão citrato nas concentrações de 60, 40, 30 e 20 mmol L^{-1} para avaliar em que situação se observava maior resposta (maior valor de área ou altura). Foi avaliado também o comprimento de onda onde se observava melhor resposta.

Foi também testada fase móvel constituída de ácido nítrico 1 mmol L⁻¹ (A):nitrato de sódio 100 mmol L⁻¹ (B) em diferentes proporções, conforme a Tabela 3.5.

3.3.3.2 Validação

Após o estudo de diferentes metodologias para a análise de bisfosfonatos por cromatografia iônica com detecção indireta no ultravioleta, foram otimizados e validados métodos para a análise quantitativa de etidronato, clodronato, alendronato e pamidronato em matérias-primas e produtos acabados.

As condições cromatográficas empregadas na determinação de etidronato e clodronato foram: coluna Phenomenex Phenosphere SAX (150 x 2,0 mm, 5 µm) (Torrance, EUA), fase móvel constituída de tampão citrato 20 mmol L⁻¹ pH 3,6; fluxo de 0,3 mL min⁻¹, volume de injeção de 50 µL, temperatura de 30 °C e comprimento de onda de detecção de 226 nm.

Para os fármacos alendronato e pamidronato as condições cromatográficas utilizadas foram: coluna Phenomenex Sphereclone SAX (250 x 2,0 mm, 5 µm) (Torrance, EUA), tampão citrato 20 mmol L⁻¹ pH 4,6 como fase móvel, fluxo de 0,25 mL min⁻¹, volume de injeção de 50 µL, temperatura de 30 °C e comprimento de onda de detecção de 222 nm.

Foram desenvolvidos dois diferentes métodos pois houve uma necessidade de diferentes condições para cada analito para se obter adequada separação dos picos do analito, da água e do sistema. Além disso, foram nessas condições que se obteve boa resposta (área ou altura do pico) e reduzido tempo de análise. Deve-se ainda ressaltar que cada composto foi analisado individualmente não havendo, portanto, a necessidade de separação entre eles.

3.3.3.2.1 Linearidade e faixa de trabalho

Foi construída curva padrão com cinco pontos, nas condições descritas em 3.3.3.2, para avaliação da linearidade. As concentrações utilizadas para a construção da curva para os fármacos etidronato e clodronato foram de 50 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto para os fármacos alendronato e pamidronato foram de 100 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Foram preparadas três replicatas para cada ponto da curva ($n = 15$).

As curvas padrão foram construídas plotando-se os valores das áreas obtidas em função da concentração. Para o alendronato foram utilizados valores de altura pois estes se mostraram mais adequados. A equação da reta e o coeficiente de correlação (R^2) foram calculados por meio do estudo da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados.

3.3.3.2.2 Especificidade

A especificidade foi avaliada analisando-se a pureza do pico. Utilizando-se detector de arranjo de diodos foi obtido o espectro no ultravioleta em diferentes pontos do pico obtido no cromatograma de cada um dos fármacos, objetivando-se verificar se havia alguma impureza presente.

3.3.3.2.3 Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. Avaliou-se a repetibilidade calculando-se o fator de resposta e o desvio padrão relativo (DPR) das 3 replicatas preparadas, nas cinco concentrações da curva padrão, sendo feitas três injeções para cada solução.

Para a avaliação da precisão intermediária foi preparada nova replicata, em três concentrações (50, 200 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para etidronato e clodronato e 100, 300 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para alendronato e pamidronato), injetada por outro analista em dia diferente, sendo os resultados comparados com a média daqueles obtidos anteriormente no cálculo da repetibilidade.

3.3.3.2.4 Limite de quantificação

Considerou-se como limite de quantificação a menor concentração onde o DPR era inferior a 2,0%.

3.3.3.2.5 Limite de detecção

Foram feitas diluições sucessivas objetivando a determinação do limite de detecção. Foi considerado como limite de detecção a menor concentração onde o pico relativo ao analito era cerca de três vezes maior que o ruído da linha de base.

3.3.3.2.6 Exatidão

Uma das maneiras de se avaliar a exatidão é por meio da incorporação de padrão em um placebo ou no produto acabado. No entanto, para os fármacos etidronato, clodronato e pamidronato nem o placebo, nem o produto acabado estavam disponíveis para utilização. Dessa forma, a exatidão do método foi inferida considerando-se que a precisão a linearidade e a especificidade haviam sido estabelecidas, conforme descrito nas normas da International Conference on Harmonisation (ICH) [81].

Para o alendronato, a exatidão foi avaliada por meio do cálculo da recuperação. Foi incorporada uma quantidade definida de padrão ao pó dos comprimidos e realizada diluição para obter-se soluções com concentrações de 100, 300 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Foram preparadas três replicatas. Os valores de altura obtidos foram convertidos em fatores de resposta e comparados com a média dos valores obtidos nas três replicatas utilizadas para a construção da curva analítica.

3.3.3.2.7 Robustez

A robustez do método foi avaliada verificando-se a influência de algumas alterações no sistema, tais como: pH da fase móvel, composição da fase móvel e temperatura.

3.3.3.2.8 Determinação de alendronato no produto acabado

Foi realizado doseamento do alendronato em dois produtos obtidos no comércio. Pesaram-se e pulverizaram-se 10 comprimidos. Pesou-se, do pó dos comprimidos, o equivalente a 10 mg de alendronato e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL. Deixou-se em agitação mecânica por 10 minutos e completou-se o volume com água. Filtrou-se, desprezando os primeiros mililitros do filtrado. Transferiram-se 3,0 mL para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com água, obtendo-se desta forma solução com concentração de 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras foram preparadas em duplicata.

3.3.4 Determinação de alendronato e pamidronato por LC-MS

3.3.4.1 Otimização das condições cromatográficas

O alendronato e o pamidronato foram analisados por LC-MS empregando coluna SAX polimérica Hamilton PRP-X100 (50 x 2,1 mm, 5 μ m). A fase móvel foi otimizada para que houvesse um compromisso entre baixo tempo de análise, bom perfil cromatográfico e boa sensibilidade. A concentração e o pH da fase móvel foram variados para alcançar estes objetivos. As fases móveis eram constituídas de ácido fórmico nas concentrações de 8, 16 e 32 mmol L⁻¹, com pH's de 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0; acertados com hidróxido de amônio. Foi também testada a utilização de metanol e acetonitrila (5 e 10%) na fase móvel. O fluxo utilizado foi de 0,2 mL min⁻¹ e temperatura de 30 °C. Foram utilizadas soluções de alendronato na concentração de 23,36 μ g mL⁻¹ e pamidronato na concentração de 24,40 μ g mL⁻¹, para otimizar a fase móvel.

3.3.4.2 Otimização das condições do espectrômetro de massas

Inicialmente, foram avaliadas as condições de gás de nebulização e gás de secagem a serem utilizadas, visando obter-se picos com elevada relação sinal/ruído. Mantendo-se o gás de secagem em 370 L h⁻¹, o gás de nebulização foi variado (6,0; 6,5; 7,0 e 7,5 kg cm⁻²). O melhor valor foi escolhido e fixado, variando-se os valores do gás de secagem (300, 250, 200 e 150 L h⁻¹).

Em seguida, após a otimização e escolha da fase móvel e dos valores do gás de secagem e gás de nebulização mais adequados foram otimizadas, por meio de planejamento fatorial ($2^3 + 1$), os parâmetros voltagem do capilar, voltagem do cone e energia do íon, conforme a Tabela 3.6. Estes parâmetros foram escolhidos, pois são aqueles que mais influenciam na formação e transmissão dos íons em electrospray. Os valores descritos na Tabela 3.6 para cada um dos parâmetros otimizados foram escolhidos de acordo com a faixa descrita pelo manual do equipamento como sendo os valores onde se obtém as melhores respostas. Utilizou-se o software Statistica para construir o modelo, sendo este analisado por ANOVA. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. A temperatura utilizada foi de 110 °C. As análises foram feitas no modo SIM, sendo monitorados os íons de m/z 248 para o alendronato e de m/z 234 para o pamidronato.

Após a análise dos dados as melhores condições foram encontradas realizando-se pequenas alterações nos valores otimizados.

Tabela 3.6. Matriz de planejamento empregada para otimização das condições de voltagem do capilar, voltagem do cone e energia do íon.

Variáveis	Nível baixo	Nível alto	
Voltagem do cone (V)	11 (-)	29 (+)	
Voltagem do capilar (kV)	2,0 (-)	4,0 (+)	
Energia do íon (V)	0 (-)	+4,0 (+)	
Experimento	Voltagem do cone	Voltagem do capilar	Energia do íon
1	-	-	-
2	-	-	+
3	-	+	-
4	+	-	-
5	-	+	+
6	+	-	+
7	+	+	-
8	+	+	+
9	0	0	0

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CROMATOGRAFIA IÔNICA COM COMPLEXAÇÃO IN-LINE COM ÍONS COBRE

Utilizando a fase móvel constituída de ácido nítrico 1,5 mmol L⁻¹ e nitrato de cobre II 0,5 mmol L⁻¹ em água não foi observado o pico relativo ao clodronato. O mesmo ocorreu quando as suas concentrações foram aumentadas para 2 mmol L⁻¹. Esta metodologia se mostrou inadequada para análises de clodronato.

Quando utilizou-se amostra contendo nitrato de cobre II e fase móvel constituída de ácido nítrico 2,0 mmol L⁻¹ foi observado o pico relativo ao clodronato no tempo de retenção de 15,03 minutos (Figura 3.3). Esse tempo elevado é devido à grande interação do complexo cobre-clodronato com a coluna. O clodronato possui 4 hidrogênios ionizáveis podendo, assim,

apresentar até 4 cargas negativas, dependendo do pH. O íon Cu^{+2} , quando complexado com o clodronato anula duas cargas negativas do mesmo, ficando o complexo cobre-clodronato com carga líquida igual a -2 . Isso faz com que o complexo tenha uma grande interação com os sítios positivos da coluna e fique mais retido.

Figura 3.3. Cromatograma da solução de clodronato $0,1017 \text{ mg mL}^{-1}$ e nitrato de cobre II $0,3751 \text{ mg mL}^{-1}$. Coluna Alltech de troca aniônica (SAX) $250 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ e fase móvel constituída de ácido nítrico $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, 240 nm .

A Figura 3.4 ilustra o cromatograma obtido aumentando-se as concentrações de clodronato e nitrato de cobre II na amostra e o fluxo passando de $1,0$ para $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. Ocorreu um aumento da área do pico, bem como uma diminuição do tempo de retenção. No entanto, o tempo de retenção ainda é elevado para análises rotineiras em controle de qualidade. Além disso, o perfil do pico obtido não é adequado.

Figura 3.4. Cromatograma da solução de clodronato $0,2018 \text{ mg mL}^{-1}$ e nitrato de cobre II $0,7502 \text{ mg mL}^{-1}$. Coluna Alltech de troca aniônica (SAX) $250 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ e fase móvel constituída de ácido nítrico $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, 240 nm .

4.2 CROMATOGRAFIA IÔNICA COM COMPLEXAÇÃO IN-LINE COM ÍONS FERRO

Os espectros obtidos para a fase móvel e para o clodronato estão demonstrados nas Figuras 3.5 e 3.6. O comprimento de onda de 240 nm foi escolhido pois neste valor foi obtido a melhor relação sinal ruído.

Figura 3.5. Espectro da solução de ácido nítrico $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e cloreto férrico $0,107 \text{ mmol L}^{-1}$.

Figura 3.6. Espectro da solução de clodronato 0,2024 mg mL⁻¹ em ácido nítrico 2,0 mmol L⁻¹ e cloreto férrico 0,107 mmol L⁻¹.

O pH com valor de 2,7 foi escolhido para a fase móvel, pois nesta condição o clodronato apresenta-se com duas cargas negativas, propiciando uma interação efetiva com os íons ferro(III).

O clodronato apresenta uma grande interação com a coluna de troca aniônica forte (sítios de ligação contendo grupos amino quaternário), levando a um tempo de retenção elevado. Por outro lado, o complexo formado apresenta uma interação menor com a coluna, devido à repulsão provocada pela carga positiva do complexo.

Desta forma, os íons ferro(III) diminuem o tempo de retenção a um valor mais adequado para análises de rotina, além de propiciar absorção na região do ultravioleta.

O pico relativo ao complexo formado se mostrou com boa simetria, com tempo de retenção de cerca de 4,0 minutos (Figura 3.7). No entanto a sensibilidade é muito baixa.

Figura 3.7. Cromatograma da solução de clodronato 0,2024 mg mL⁻¹. Coluna Alltech de troca aniônica (SAX) 250 x 4,6 mm, 5 µm e fase móvel constituída de ácido nítrico 2,0 mmol L⁻¹ e cloreto férrico 0,1070 mmol L⁻¹.

4.3 CROMATOGRAFIA IÔNICA COM DETECÇÃO INDIRETA NO UV

4.3.1 Testes iniciais e otimização

4.3.1.1 Alendronato

O método onde se utilizou ácido nítrico como fase móvel não deu bons resultados. O alendronato não eluiu da coluna cromatográfica nas concentrações de ácido nítrico utilizadas (0,01 mmol L⁻¹ a 3,16 mmol L⁻¹). Nestas concentrações (pH variando de 2,5 a 5,0) o alendronato encontra-se desprotonado, interagindo muito com os grupos amônio quaternários da coluna. Como a coluna era de sílica, não foi possível utilizar uma fase móvel mais concentrada, ou seja, com pH abaixo de 2,5.

Utilizando ácido cítrico como fase móvel, foi possível aumentar sua concentração, sem que o pH ficasse abaixo de 2,5. Além disso, o íon citrato é um trocador mais efetivo que

o íon nitrato. No entanto, nas condições empregadas, o alendronato permaneceu retido na coluna.

A fase móvel constituída de tampão citrato 10 mmol L⁻¹ não possibilitou a eluição do alendronato. No entanto, nas outras concentrações, o alendronato eluiu da coluna em tempo relativamente curto, em torno de 3,0 minutos. Além do pico do alendronato foi verificada a presença de um outro pico, identificado como um pico do sistema, característico de métodos empregando cromatografia iônica e detecção indireta no ultravioleta. Este pico resulta de uma zona deficiente de eluente formada pela injeção da amostra e depende do pH da amostra injetada [82]. A Tabela 3.7 demonstra a relação entre os tempos de retenção dos picos do alendronato e do sistema, obtida quando se utiliza tampão citrato 30 mmol L⁻¹ como fase móvel.

Tabela 3.7. Tempos de retenção dos picos do alendronato e do sistema utilizando tampão citrato 30 mmol L⁻¹.

pH	Tempo de retenção	
	Alendronato	Pico do sistema
7,0	-	-
6,0	2,18	3,62
5,0	2,30	3,01
4,8	2,35	2,86
4,6	2,42	2,77
4,4	2,52	2,75
4,2	2,71	2,75
4,0	2,75	2,72

À medida que o pH abaixa, o tempo de retenção do alendronato aumenta, ou seja, há uma diminuição da força da fase móvel (há um aumento da proporção de ácido cítrico e uma diminuição da proporção de citrato). Por outro lado, o tempo de retenção do pico do sistema diminui conforme o pH abaixa, o que dificulta a separação dos dois picos. Melhor separação foi obtida em pH 5,0, quando se utiliza tampão citrato 30 mmol L⁻¹.

A mesma avaliação foi feita utilizando as fases móveis constituídas de tampão citrato nas concentrações de 18, 20 e 25 mmol L⁻¹. A condição onde houve melhor resolução entre os picos do alendronato e do sistema foi utilizando tampão 18 mmol L⁻¹ e pH 4,8. No entanto, nas concentrações de 20, 25 e 30 mmol L⁻¹ as respostas foram parecidas. A Figura 3.8 apresenta o cromatograma do alendronato obtido nestas condições.

Figura 3.8. Cromatograma da solução de alendronato 844 µg mL⁻¹ obtido com coluna Phenosphere SAX 150 x 4,6 mm, 5 µm, tampão citrato 18 mmol L⁻¹ pH 4,8 como fase móvel, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, temperatura de 30 °C, injeção de 20 µL, comprimento de onda de 220 nm, polaridade normal.

4.3.1.2 Pamidronato

As condições onde se obteve melhor separação entre os picos do pamidronato e do sistema ocorreu quando se utilizou tampão citrato 30 mmol L⁻¹ pH 4,8, não havendo, contudo, separação de linha de base (Figura 3.9).

O método que utilizou ácido nítrico 1 mmol L⁻¹:nitrato de sódio 100 mmol L⁻¹ em diferentes proporções não apresentou bom resultado, não sendo possível verificar se o pamidronato eluída da coluna.

Figura 3.9. Cromatograma da solução de pamidronato $863 \mu\text{g mL}^{-1}$ obtido com coluna Phenosphere SAX $150 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, tampão citrato 30 mmol L^{-1} pH 4,8 como fase móvel, fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de 30°C , injeção de $20 \mu\text{L}$, comprimento de onda de 220 nm , polaridade normal.

4.3.1.3 Etidronato

Os métodos que empregavam ácido nítrico e ácido cítrico como fase móvel não deram bons resultados, pois o etidronato não eluiu da coluna cromatográfica. Estas fases móveis interagem pouco com os sítios de ligação, não sendo capazes de remover o fármaco ligado.

O método que utilizava tampão citrato 30 mmol L^{-1} como fase móvel se mostrou adequado para a separação do etidronato. Diferentes tempos de retenção são obtidos variando-se o pH da fase móvel (Tabela 3.8).

Com a diminuição da proporção de citrato de sódio no tampão (diminuição do pH), diminui-se a força da fase móvel, com conseqüente aumento do tempo de retenção do etidronato. A partir de pH 4,4 já foi possível obter resolução de linha de base entre os picos do etidronato e do sistema.

Utilizando tampão citrato 20 mmol L^{-1} foi possível obter picos com maiores valores de área. O comprimento de onda onde obteve-se melhor resposta (altura do pico) foi de 226 nm (Figura 3.10)

Tabela 3.8. Tempos de retenção dos picos do etidronato e do sistema utilizando tampão citrato 30 mmol L⁻¹

pH	Tempo de retenção	
	Etidronato	Pico do sistema
7,0	-	-
6,0	2,11	3,37
5,0	2,54	-
4,8	2,57	2,57
4,6	2,95	2,55
4,4	3,31	2,55
4,2	4,13	2,56
4,0	4,67	2,55
3,8	5,70	2,49
3,6	7,15	2,37
3,4	11,29	2,21
3,0	-	2,02

Figura 3.10. Cromatograma da solução de etidronato 400 µg mL⁻¹ obtido com coluna Phenosphere SAX 150 x 4,6 mm, 5 µm, tampão citrato 20 mmol L⁻¹ pH 4,2 como fase móvel, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, temperatura de 30 °C, injeção de 20 µL, comprimento de onda de 226 nm, polaridade invertida.

4.3.1.4 Clodronato

A Tabela 3.9 demonstra os valores de tempo de retenção obtidos para os picos do clodronato e do sistema em diferentes valores de pH.

Tabela 3.9. Tempos de retenção dos picos do clodronato e do sistema utilizando tampão citrato 30 mmol L⁻¹.

pH	Tempo de retenção	
	Clodronato	Pico do sistema
7,0	-	-
6,0	2,26	3,37
5,0	2,61	-
4,8	2,57	2,57
4,6	2,99	2,55
4,4	3,33	2,55
4,2	4,21	2,56
4,0	4,81	2,55
3,8	6,01	2,49
3,6	7,96	2,37
3,4	14,17	2,21
3,0	-	2,02

Aqui também se pôde observar que uma diminuição do pH causou aumento do tempo de retenção do clodronato. Boa separação foi alcançada a partir de pH 4,4. Em valores de pH inferiores a 3,8 os picos apresentam “cauda”, além do tempo de retenção se tornar elevado.

A fase móvel onde foi obtida melhor resposta (área ou altura do pico) foi a de tampão citrato 20 mmol L⁻¹ pH 4,2. Neste pH houve boa separação entre o pico do clodronato e aquele do sistema (Figura 3.11).

Figura 3.11. Cromatograma da solução de clodronato 898 µg mL⁻¹ obtido com coluna Phenosphere SAX 150 x 4,6 mm, 5 µm, tampão citrato 20 mmol L⁻¹ pH 4,2 como fase móvel, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, temperatura de 30 °C, injeção de 20 µL, comprimento de onda de 225 nm, polaridade invertida.

Quando se utilizou fase móvel constituída de ácido nítrico 1 mmol L⁻¹ (A):nitrato de sódio 100 mmol L⁻¹ (B) na proporção de 60:40 foi possível eluir o clodronato (Figura 3.12). No entanto, o valor de área obtido foi bastante inferior àquele obtido com tampão citrato como fase móvel, sendo este sistema escolhido para análise do clodronato.

Figura 3.12. Cromatograma da solução de clodronato 906,5 µg mL⁻¹ obtido com coluna Phenosphere SAX 150 x 4,6 mm, 5 µm, ácido nítrico 1 mmol L⁻¹ (A):nitrato de sódio 100 mmol L⁻¹ (B) (60:40) como fase móvel, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, temperatura de 30 °C, injeção de 20 µL, comprimento de onda de 243 nm, polaridade normal.

4.3.2 Validação

4.3.2.1 Etidronato

4.3.2.1.1 Linearidade e faixa de trabalho

Os picos obtidos nas diversas concentrações da solução padrão de etidronato se mostraram simétricos e com tempo de retenção de cerca de 3,3 minutos (Figura 3.13). Além do pico relativo ao etidronato foi verificada a presença de outro pico, próximo de 2,3 minutos, identificado como pico do sistema.

Figura 3.13. Cromatograma da solução padrão de etidronato a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ obtido com coluna Phenosphere SAX 150 x 2,0 mm, 5 μm , tampão citrato 20 mmol L^{-1} pH 3,6 como fase móvel, fluxo de 0,3 mL min^{-1} , temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$, injeção de 50 μL , 226 nm, polaridade invertida.

A detecção indireta no UV monitora a diminuição da absorbância do eluente tampão citrato, que exibe um máximo de absorção UV entre 200 e 210 nm, devido à substituição dos ânions citrato pelos bisfosfonatos eluindo na célula do detector. O cromatograma apresentado na Figura 3.13 reflete essencialmente um sinal negativo (diminuição da absorbância) com a polaridade invertida. A faixa de comprimento de onda útil para a análise dos bisfosfonatos foi de 220 a 230 nm. Comprimentos de onda menores que esses produziram elevado ruído dificultando a detecção dos analitos.

Nas condições otimizadas todos os quatro bisfosfonatos avaliados eluíram como espécies iônicas de carga, predominantemente como uma espécie divalente (-2).

A Tabela 3.10 apresenta os valores de área obtidos para a construção da curva padrão de etidronato. A representação gráfica da curva padrão pode ser visualizada na Figura 3.14. A equação da reta, determinada por meio do estudo da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados foi: $Y = -21248,60 + 1971,42X$. O coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,999, valor próximo de 1, o que indica a existência de correlação linear entre as concentrações e os valores de área obtidos na faixa de concentração de 50 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 3.10. Valores de área obtidos para a construção da curva padrão de etidronato.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	51,05	102,1	204,2	306,3	408,4
	52,45	104,9	209,8	314,7	419,6
	53,15	106,3	212,6	318,9	425,2
Área	80827,0	178515,7	379902,7	562813,7	787230,0
	83294,3	189768,0	402871,7	591992,7	817670,3
	85561,7	189271,3	397236,3	591638,3	827944,3

Figura 3.14. Representação gráfica da curva padrão de etidronato.

4.3.2.1.2 Especificidade

A Figura 3.15 apresenta os espectros no ultravioleta obtidos em onze pontos diferentes, no começo, no meio e no fim do pico do cromatograma do etidronato. Os espectros obtidos são muito semelhantes, sendo a porcentagem de pureza em todo o pico maior que 99,0%. Cada composto possui um espectro específico no UV, sendo isso também válido para absorbâncias negativas (detecção indireta). Assim, se alguma impureza estivesse presente nos picos, um espectro UV diferente seria detectado. No entanto, isso não foi observado.

Figura 3.15. Espectros do etidronato, obtidos com detector de DAD, em diferentes pontos do pico.

4.3.2.1.3 Precisão

A Tabela 3.11 demonstra os valores de área obtidos nas diferentes concentrações de solução padrão de etidronato. O DPR foi inferior a 2,0% em todas as concentrações avaliadas, o que indica que o método possui boa precisão em termos de repetibilidade.

Tabela 3.11. Valores de área e DPR obtidos para o cálculo da repetibilidade.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Áreas	Fator de resposta	Média dos fatores de resposta	DPR (%)
51,05	80827,0	1614,93	1604,30	0,89
52,45	83294,3	1588,07		
53,15	85561,7	1609,82		
102,1	178515,7	1748,44	1779,30	1,70
104,9	189768,0	1809,04		
106,3	189271,3	1780,54		
204,2	379902,7	1860,44	1883,10	1,72
209,8	402871,7	1920,27		
212,6	397236,3	1868,47		
306,3	562813,7	1837,46	1857,95	1,18
314,7	591992,7	1881,13		
318,9	591638,3	1855,25		
408,4	787230,0	1927,60	1941,16	0,61
419,6	817670,3	1948,70		
425,2	827944,3	1947,19		

Os valores de área e DPR obtidos no cálculo da precisão intermediária estão demonstrados na Tabela 3.12. O DPR foi menor que 2,0% indicando pequena variabilidade quando a análise é feita em dia diferente e por outro analista.

Tabela 3.12. Valores de área e DPR obtidos para o cálculo da precisão intermediária.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área	Fator de resposta	Fator de resposta (média das 3 replicatas)	DPR (%)
53,0	87034,7	1642,16	1604,30	1,65
212,0	400325,3	1888,33	1883,10	0,20
424,0	838363	1977,27	1941,16	1,30

4.3.2.1.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, pois essa foi a mais baixa concentração onde o DPR foi inferior a 2%.

4.3.2.1.5 Limite de detecção

A concentração da solução que apresentou pico relativo ao etidronato de cerca de três vezes o ruído da linha de base foi de $5,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo este valor considerado o limite de detecção.

4.3.2.1.6 Exatidão

O método foi considerado exato uma vez que apresentou especificidade, linearidade e precisão adequados.

4.3.2.1.7 Robustez

Considerando que o método desenvolvido é baseado em troca iônica, os parâmetros pH e composição da fase móvel influenciaram o tempo de retenção, a área e a resolução dos pico do etidronato e do sistema. Portanto, devem ser bem controlados. A temperatura, na faixa de 30 °C a 50 °C, exerceu pouca influência no método.

4.3.2.2 Clodronato

4.3.2.2.1 Linearidade e faixa de trabalho

O cromatograma da solução padrão de clodronato está demonstrado na Figura 3.16. O pico relativo ao clodronato possui tempo de retenção de cerca de 3,5 minutos e apresenta boa resolução em relação ao pico do sistema.

Figura 3.16. Cromatograma da solução padrão de clodronato 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtido com coluna Phenosphere SAX 150 x 2,0 mm, 5 μm , tampão citrato 20 mmol L^{-1} pH 3,6 como fase móvel, fluxo de 0,3 mL min^{-1} , temperatura de 30 °C, injeção de 50 μL , 226 nm, polaridade invertida.

Os valores de área obtidos nas diferentes concentrações utilizadas para a obtenção da curva padrão estão apresentados na Tabela 3.13.

A representação gráfica da curva padrão para o clodronato está apresentado na Figura 3.17. A equação da reta e o coeficiente de correlação são, respectivamente, $Y = -6868,83 + 1322,87X$ e 0,999. Este resultado indica que existe uma correlação linear entre os valores de área e concentração.

Tabela 3.13. Valores de área obtidos para a construção da curva padrão de clodronato.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	50,75	101,5	203,0	304,5	406,0
	54,25	108,5	217,0	325,5	434,0
	51,6	103,2	206,4	309,6	412,8
Área	61140,7	129909,0	259043,0	401905,7	534154,3
	64353,7	137386,0	274709,7	424947,0	572534,0
	63266,0	129664,3	260539,7	405762,7	528033,7

Figura 3.17. Representação gráfica da curva padrão de clodronato.

4.3.2.2.2 Especificidade

Na Figura 3.18 estão apresentados os espectros no ultravioleta do clodronato obtidos em diferentes pontos do pico cromatográfico. A similaridade entre os espectros foi superior a 98,0% em toda a faixa avaliada.

Figura 3.18. Espectros do etidronato, obtidos com detector de DAD, em diferentes pontos do pico.

4.3.2.2.3 Precisão

O método mostrou adequada repetibilidade em todas as concentrações utilizadas na obtenção da curva padrão (50 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O DPR foi menor que 2,0% em todas as concentrações (Tabela 3.14).

Tabela 3.14. Valores de área e DPR obtidos para o cálculo da repetibilidade.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Áreas	Fator de resposta	Média dos fatores de resposta	DPR (%)
50,75	61140,7	1204,74	1205,69	1,65
54,25	64353,7	1186,24		
51,6	63266,0	1226,09		
101,5	129909,0	1279,89	1267,52	0,93
108,5	137386,0	1266,23		
103,2	129664,3	1256,44		
203,0	259043,0	1276,07	1268,10	0,56
217,0	274709,7	1265,94		
206,4	260539,7	1262,30		
304,5	401905,7	1319,89	1312,00	0,56
325,5	424947,0	1305,52		
309,6	405762,7	1310,60		
406,0	534154,3	1315,65	1304,67	1,70
434,0	572534,0	1319,20		
412,8	528033,7	1279,15		

O método também apresentou baixos valores de DPR quando se avaliou a variação em dia diferente com análise executada por outro analista. A precisão intermediária se mostrou adequada, com valores de DPR menores que 2,0% (Tabela 3.15).

Tabela 3.15. Valores de área e DPR obtidos para o cálculo da precisão intermediária.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área	Fator de resposta	Fator de resposta (média das 3 replicatas)	DPR (%)
50,7	62111,7	1225,08	1205,69	1,13
202,8	258880	1276,53	1268,10	0,47
405,6	533154,3	1314,48	1304,67	0,53

4.3.2.2.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação do método foi de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo esta a menor concentração onde foi observado DPR menor que 2,0%.

4.3.2.2.5 Limite de detecção

O limite de detecção foi de $5,07 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo esta a concentração onde o sinal relativo ao clodronato era cerca de três vezes maior que o ruído da linha de base.

4.3.2.2.6 Exatidão

A exatidão foi inferida para o método considerando que a linearidade, a precisão e a especificidade foram avaliadas e se mostraram adequadas.

4.3.2.2.7 Robustez

O pH e a composição da fase móvel alteraram o tempo de retenção e a área do clodronato bem como sua resolução do pico do sistema, devendo por isso ser bem controlados. A temperatura, na faixa de 30 °C a 50 °C, não foi um parâmetro que exerceu influência significativa.

4.3.2.3 Pamidronato

4.3.2.3.1 Linearidade e faixa de trabalho

O cromatograma da solução padrão de pamidronato está demonstrado na Figura 3.19. O pico apresentou adequada resolução em relação aos picos da água, usada como solvente, e do sistema. O tempo de retenção foi de, aproximadamente, 4,3 minutos.

Figura 3.19. Cromatograma da solução padrão de pamidronato 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtido com coluna Spheredclone SAX 250 x 2,0 mm, 5 μm , tampão citrato 20 mmol L^{-1} pH 4,6 como fase móvel, fluxo de 0,25 mL min^{-1} , temperatura de 30 °C, injeção de 50 μL , 222 nm, polaridade invertida.

Os valores de área obtidos em cada concentração para a construção da curva analítica, na faixa de 100 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, estão apresentados na Tabela 3.16.

Tabela 3.16. Valores de área obtidos para a construção da curva padrão de pamidronato.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	104,8	209,6	314,4	419,2	524,0
	108,1	216,2	324,3	432,4	540,5
	108,9	217,8	326,7	435,6	544,5
Área	252694,5	536912,3	877975,3	1171478,0	1496407,0
	255515,7	544348,0	872486,0	1181837,0	1508829,3
	261645,0	567523,7	893297,3	1224456,7	1521317,0

A representação gráfica da curva analítica para determinação de pamidronato está apresentada na Figura 3.20.

Figura 3.20. Representação gráfica da curva padrão de pamidronato.

A equação da reta, obtida por meio do estudo da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, foi $Y = -65694,00 + 2932,01X$. O coeficiente de correlação foi de 0,999, o que indica que há uma correlação linear entre os valores de concentração e os valores de área obtidos.

4.3.2.3.2 Especificidade

A comparação dos espectros no ultravioleta de diferentes pontos do pico cromatográfico da solução padrão de pamidronato (Figura 3.21) mostrou uma similaridade superior a 99,0%, o que indica que no pico obtido não havia outro composto co-eluindo.

Figura 3.21. Espectros do pamidronato, obtidos com detector de DAD, em diferentes pontos do pico.

4.3.2.3.3 Precisão

A Tabela 3.17 apresenta os valores de área obtidos nas diferentes concentrações utilizadas para construção da curva analítica. O DPR foi menor que 2,0% em todos os pontos, demonstrando que o método possui adequada repetibilidade.

O método também apresentou DPR menor que 2,0% quando resultados obtidos em dia diferente e por outro analista foram comparados com aqueles obtidos para obtenção da curva analítica (Tabela 3.18). Dessa forma, a precisão intermediária se mostrou satisfatória.

Tabela 3.17. Valores de área e DPR obtidos para o cálculo da repetibilidade.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Áreas	Fator de resposta	Média dos fatores de resposta	DPR (%)
104,8	252694,5	2411,21	2392,51	1,06
108,1	255515,7	2363,70		
108,9	261645,0	2402,63		
209,6	536912,3	2561,60	2561,70	1,72
216,2	544348,0	2517,80		
217,8	567523,7	2605,71		
314,4	877975,3	2792,50	2739,06	1,87
324,3	872486,0	2690,37		
326,7	893297,3	2734,30		
419,2	1171478,0	2794,56	2779,58	1,47
432,4	1181837,0	2733,20		
435,6	1224456,7	2810,97		
524,0	1496407,0	2855,74	2813,75	1,29
540,5	1508829,3	2791,54		
544,5	1521317,0	2793,97		

Tabela 3.18. Valores de área e DPR obtidos para o cálculo da precisão intermediária.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área	Fator de resposta	Fator de resposta (média das 3 replicatas)	DPR (%)
105,0	248528	2366,93	2392,51	0,76
315,0	843255	2677,00	2739,06	1,62
525,0	1474226,7	2808,05	2813,75	0,14

4.3.2.3.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação obtido foi de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, menor concentração onde o DPR foi menor que 2,0%

4.3.2.3.5 Limite de detecção

A concentração onde o sinal do pico relativo ao pamidronato foi de cerca de três vezes foi de 26,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo este valor considerado como limite de detecção.

4.3.2.3.6 Exatidão

A exatidão do método foi considerada adequada uma vez que a precisão, a linearidade e a especificidade foram avaliadas e estabelecidas.

4.3.2.3.7 Robustez

Os parâmetros pH e composição da fase móvel, uma vez alterados, mudaram os valores de área, tempo de retenção e resolução do sistema. Devem, portanto, ser bem controlados durante a análise. A temperatura, na faixa de 30 °C a 50 °C, não exerceu influência significativa no sistema.

4.3.2.4 Alendronato

4.3.2.4.1 Linearidade e faixa de trabalho

O cromatograma da solução padrão de alendronato está demonstrado na Figura 3.22. O tempo de retenção do pico referente ao alendronato é de cerca de 4,3 minutos. A resolução do pico do alendronato em relação aos picos da água e do sistema se mostrou adequada para a determinação do fármaco.

Figura 3.22. Cromatograma da solução padrão de alendronato $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ obtido com coluna Sphèreclone SAX $250 \times 2,0 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, tampão citrato 20 mmol L^{-1} pH 4,6 como fase móvel, fluxo de $0,25 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de 30°C , injeção de $50 \mu\text{L}$, 222 nm , polaridade invertida.

Os valores de altura do pico obtidos para cada concentração, na faixa de 100 a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizados para a construção da curva analítica, estão demonstrados na Tabela 3.19.

Tabela 3.19. Valores de altura obtidos para a construção da curva padrão de alendronato.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	104,0	208,0	312,0	416,0	520,0
	108,5	217,0	325,5	434,0	542,5
	104,5	209,0	313,5	418,0	522,5
Altura	17186,3	37581,7	61181,0	88146,0	111208,0
	17669,3	39557,7	64288,0	90740,7	116659,0
	17271,5	39211,0	63173,3	85261,3	110123,0

A representação gráfica da curva analítica para a determinação de alendronato está apresentada na Figura 3.23. A equação da reta e o coeficiente de correlação são, respectivamente, $Y = -8004,31 + 226,99X$ e 0,998. O resultado demonstra que há uma correlação linear entre os valores de concentração e altura obtidos.

Figura 3.23. Representação gráfica da curva padrão de alendronato.

4.3.2.4.2 Especificidade

Os espectros no ultravioleta de vários pontos do pico cromatográfico do alendronato estão demonstrados na Figura 3.24. A similaridade entre os espectros foi maior que 98,0% em todos os pontos analisados, o que demonstra que não havia outro composto co-eluindo com o alendronato.

Figura 3.24. Espectros do pamidronato, obtidos com detector de DAD, em diferentes pontos do pico.

4.3.2.4.3 Precisão

O método apresentou adequada repetibilidade, com DPR menor que 2,0% em todas as concentrações analisadas (Tabela 3.20).

Tabela 3.20. Valores de altura e DPR obtidos para o cálculo da repetibilidade.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Altura	Fator de resposta	Média dos fatores de resposta	DPR (%)
104,0	17186,3	165,25	164,46	0,85
108,5	17669,3	162,85		
104,5	17271,5	165,28		
208,0	37581,7	180,68	183,53	1,98
217,0	39557,7	182,29		
209,0	39211,0	187,61		
312,0	61181,0	196,09	198,37	1,42
325,5	64288,0	197,51		
313,5	63173,3	201,51		
416,0	88146,0	211,89	208,32	1,93
434,0	90740,7	209,10		
418,0	85261,3	203,97		
520,0	111208,0	213,86	213,22	1,04
542,5	116659,0	215,04		
522,5	110123,0	210,76		

O método também apresentou adequada precisão intermediária. Os valores de DPR nas concentrações avaliadas (100, 300 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram menores que 2,0% (Tabela 3.21).

Tabela 3.21. Valores de altura e DPR obtidos para o cálculo da precisão intermediária.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Altura	Fator de resposta	Fator de resposta (média das 3 replicatas)	DPR (%)
108,0	17613,0	163,08	164,46	0,60
324,0	66077,7	203,94	198,37	1,96
540,0	118413,0	219,28	213,22	1,98

4.3.2.4.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação obtido foi de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, pois esta foi a menor concentração onde o DPR entre as replicatas foi menor que 2,0%.

4.3.2.4.5 Limite de detecção

A concentração onde o sinal referente ao alendronato era cerca de três vezes maior que o ruído da linha de base foi de $25,08 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo este valor considerado o limite de detecção.

4.3.2.4.6 Exatidão

A Tabela 3.22 demonstra os valores de área obtidos no cálculo da recuperação. Os valores de porcentagem de recuperação obtidos variaram de 97,12 a 102,92%, valores próximos de 100%, o que indica que o método possui exatidão adequada.

Tabela 3.22. Valores de altura e recuperação obtidos para o cálculo da exatidão.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Altura	Fator de resposta	Fator de resposta (média das 3 replicatas)	Recuperação (%)
109,3	18097,3	165,57	164,46	100,67
108,6	17975,7	165,52		100,64
108,4	18348,5	169,27		102,92
327,9	64136,0	195,60	198,37	98,60
325,8	62767,7	192,66		97,12
325,2	63473,7	195,18		98,39
546,5	118393,7	216,64	213,22	101,60
543,0	118010,0	217,33		101,93
542,0	117809,0	217,36		101,94

4.3.2.4.7 Robustez

O pH e a composição da fase móvel alteraram o tempo de retenção e a altura do alendronato bem como sua resolução do pico do sistema, devendo por isso ser bem controlados. A temperatura não foi um parâmetro que exerceu influência significativa.

4.3.2.4.8 Determinação de alendronato no produto acabado

A Figura 3.25 apresenta o cromatograma do medicamento referência na concentração de $300,37 \mu\text{g mL}^{-1}$. O pico apresentou boa resolução em relação aos picos da água e do sistema.

Os valores de área e teor em relação ao valor rotulado obtidos no doseamento do medicamento referência estão demonstrados na Tabela 3.23.

Figura 3.25. Cromatograma da solução do medicamento referência $300,37 \mu\text{g mL}^{-1}$ obtido com coluna Sphercclone SAX 250 x 2,0 mm, 5 μm , tampão citrato 20 mmol L^{-1} pH 4,6 como fase móvel, fluxo de $0,25 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de 30°C , injeção de $50 \mu\text{L}$, 222 nm, polaridade invertida.

Tabela 3.23. Valores de altura e teor obtidos para o medicamento referência.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Altura	% do valor rotulado
300,19	60939	101,18
300,37	63047	104,21

O medicamento referência possui teor próximo de 100,0% do valor rotulado, valor considerado adequado. As especificações farmacopéicas para a maioria dos fármacos se situa na faixa de 90,0 a 110,0% do valor rotulado.

A Figura 3.26 apresenta o cromatograma do alendronato encontrado no medicamento genérico. O perfil do cromatograma é semelhante àquele obtido para o medicamento referência.

A Tabela 3.24 apresenta os valores de área obtidos nas duas replicatas realizadas para o doseamento do alendronato no medicamento genérico, bem como o teor encontrado.

O teor encontrado para o medicamento genérico também se mostrou adequado, dentro da faixa de 90,0 a 110,0%, demonstrando a qualidade do medicamento em termos do teor do princípio ativo.

Figura 3.26. Cromatograma da solução do medicamento genérico $300,21 \mu\text{g mL}^{-1}$ obtido com coluna Spheredclone SAX 250 x 2,0 mm, 5 μm , tampão citrato 20 mmol L^{-1} pH 4,6 como fase móvel, fluxo de $0,25 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de 30°C , injeção de $50 \mu\text{L}$, 222 nm, polaridade invertida.

Tabela 3.24. Valores de altura e teor obtidos para o medicamento genérico.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Altura	% do valor rotulado
359,10	70321,0	96,09
348,24	68972,3	97,38

4.4 DETERMINAÇÃO DE ALENDRONATO E PAMIDRONATO POR LC-MS

4.4.1 Otimização das condições cromatográficas

Os valores de área, tempo de retenção e relação sinal/ruído (S/N) para cada uma das fases móveis avaliadas na determinação de alendronato e pamidronato estão descritos nas Tabelas 3.25 e 3.26, respectivamente.

A presença de espécies iônicas não voláteis, como tampões fosfato ou sulfato, na interface electrospray produz a deposição de sais nas superfícies metálicas do instrumento podendo resultar em uma completa perda de transmissão de íons. Assim, quando electrospray é utilizada com cromatografia líquida tampões voláteis compostos de bases ou ácidos fracos devem ser utilizados [83]. Dessa forma, o tampão volátil formiato de amônio foi escolhido para a realização desse estudo.

Considerando-se os valores de área, S/N e tempo de retenção, escolheu-se a fase móvel tampão formiato de amônio 16 mmol L⁻¹ pH 4,5 para o alendronato. O analito, nestas condições, possui baixo tempo de retenção (3,7 minutos) e S/N de, aproximadamente, 700. Para o pamidronato, a melhor condição encontrada foi tampão formiato 32 mmol L⁻¹ e pH 4,0.

O uso de solvente orgânico na fase móvel também foi avaliado. Utilizando-se metanol a 10%, obteve-se valores de área elevados. No entanto, o ruído também aumentou, diminuindo a relação S/N. Assim, optou-se por utilizar fase móvel sem solvente orgânico.

Tabela 3.25. Valores de área, tempo de retenção e relação sinal/ruído obtidos para as diferentes fases móveis avaliadas na determinação de alendronato.

pH	Concentração (mmol L ⁻¹)	t _R (min.)	Área	Relação sinal/ruído
3,0	8	19,02	102478	20,48
	16	8,69	98131	117,96
	32	4,44	113554	235,93
3,5	8	9,52	44204	166,46
	16	4,79	42847	199,14
	32	2,58	31264	196,18
4,0	8	9,52	56796	142,58
	16	3,86	76268	443,83
	32	2,02	42062	231,81
4,5	8	10,88	127327	123,68
	16	3,70	71688	699,56
	32	1,88	36763	293,68
5,0	8	17,22	88406	28,20
	16	4,93	82215	839,89
	32	2,29	28916	539,13

Tabela 3.26. Valores de área, tempo de retenção e relação sinal/ruído obtidos para as diferentes fases móveis avaliadas na determinação de pamidronato.

pH	Concentração (mmol L ⁻¹)	t _R (min.)	Área	Relação sinal/ruído
3,0	8	22,11	62558	35,63
	16	9,37	58392	84,27
	32	4,68	55813	372,24
3,5	8	11,46	24219	36,63
	16	5,16	43409	167,29
	32	2,69	18772	132,68
4,0	8	11,73	43092	49,14
	16	4,22	79375	284,51
	32	2,11	46025	367,98
4,5	8	16,40	75213	23,57
	16	4,80	66784	209,33
	32	2,08	29706	224,36
5,0	8	>26,00	n.a.*	n.a.*
	16	7,03	72307	109,21
	32	2,59	29886	262,43

4.4.2 Otimização das condições do espectrômetro de massas

Foram alcançados melhores resultados quando se utilizou gás de secagem a 250 L h⁻¹ e gás de nebulização a 7,0 kg cm⁻², conforme demonstrado na Tabela 3.27.

A Figura 3.27 ilustra o cubo de respostas onde estão apresentados os valores de área obtidos em cada um dos experimentos executados.

Tabela 3.27. Valores de área obtidos na otimização das condições de gás de secagem e de nebulização.

Gás de nebulização (L h⁻¹)	Gás de secagem (kg cm⁻²)	Área
6,0	370	15154
6,5	370	63913
7,0	370	105912
7,5	370	106863
7,0	300	83599
7,0	250	94577
7,0	200	94309
7,0	150	61305

Na Figura 3.28 está representado um diagrama de Pareto onde pode-se visualizar a influência de cada um dos parâmetros testados na otimização. Por meio deste diagrama, verifica-se que melhores resultados foram alcançados quando utilizou-se os valores maiores das variáveis. Assim, melhores respostas foram obtidas com voltagem do capilar de 4,0 kV, voltagem do cone de 29 V e energia do íon de +4,0 V. Em seguida fez-se um ajuste destas variáveis, alcançando-se melhores resultados quando foram utilizados voltagem do capilar de 4,5 kV, voltagem do cone de 20 V e energia do íon de +4,0 V.

O fator mais importante para a obtenção de melhor resposta foi a energia do íon. Este parâmetro está relacionado com a energia que é fornecida aos íons para que ele atravessasse o analisador quadrupolo. Segundo o manual do equipamento ele deve ser mantido o mais baixo possível para obter-se boa resolução, pois valores elevados aumentam o ruído. No entanto, na faixa avaliada (0 a +4 V) a melhor resposta foi obtida com energia do íon de +4,0 V, demonstrando que este valor aumentou a intensidade do sinal analítico sem aumentar o ruído.

A voltagem do capilar também apresentou um efeito positivo, ou seja valores maiores produziram melhor resposta. Em electrospray ocorre a aplicação de um campo elétrico na ponta do capilar contendo uma solução de íons. A presença do campo leva à formação de uma camada dipolar na extremidade do capilar. Quando o capilar está positivo, os íons positivos estão próximos da ponta do capilar, havendo a formação de um cone e a emissão de pequenas gotas carregadas positivamente. O campo elétrico requerido para gerar uma adequada resposta está relacionado com a tensão superficial do solvente utilizado [83]. Assim, a utilização de uma fase aquosa, como ocorreu nesse estudo, faz com que seja necessária a utilização de uma voltagem do capilar elevada. Além disso, a associação de energia do íon alta com voltagem do capilar alta também produziu aumento da resposta.

A voltagem do cone também apresentou um efeito positivo. Este parâmetro está relacionado com a formação de fragmentos após a formação das gotas carregadas e a dessolvatação. Conforme o manual do equipamento valores de voltagem do cone de até 130 V podem ser utilizados. Neste estudo foram utilizados valores menores para se evitar a formação de fragmentos, havendo boa resposta com voltagem de 29 V.

Figura 3.27. Cubo de respostas obtido na otimização das condições do espectrômetro de massas.

Figura 3.28. Diagrama de Pareto obtido na otimização de parâmetros do espectrômetro de massas.

As Figuras 3.29 e 3.30 ilustram um cromatograma e um espectro de massas típicos obtidos nas condições otimizadas.

Figura 3.29. Cromatograma do padrão analítico de alendronato na concentração de $26,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ nas condições otimizadas.

Figura 3.30. Espectro do padrão de alendronato na concentração de $26,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ nas condições otimizadas.

O emprego do planejamento fatorial, bem como a avaliação de diferentes fases móveis, permitiu otimizar o método e obter-se a melhor resposta do sistema. No entanto, a sensibilidade alcançada ainda é baixa (o limite de quantificação foi de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e, apesar de adequada para o controle de qualidade do composto em formulações comerciais, ainda não é suficiente para analisar os fármacos alendronato e pamidronato em fluidos biológicos.

Em electrospray é importante que o solvente utilizado na fase móvel possua uma tensão superficial que permita a formação de um spray estável. Para que isso ocorra é necessário que a fase móvel seja composta de, pelo menos, 50% de um solvente orgânico moderadamente polar tal como metanol ou acetonitrila, sendo o restante composto por solvente aquoso. Nesse estudo foi necessária a utilização de uma fase móvel completamente aquosa (tampão formiato), que possui elevada tensão superficil, dificultando a obtenção de um adequado spray [84]. O emprego de fase móvel aquosa também causa a formação de íons instáveis, com baixa intensidade, pois o elevado calor de vaporização da água impede sua evaporação das gotas formadas, dificultando a liberação dos íons [85]. A utilização de metanol e acetonitrila foi avaliada (5 e 10%) não havendo, contudo, boa resposta.

Além disso, os íons amônio presentes na fase móvel causam supressão do sinal para compostos ácidos quando analisados por electrospray. Essa supressão do sinal parece ser devida ao pareamento que ocorre entre o cátion amônio e os ânions do analito. Esse processo de pareamento iônico mascara os ânions do analito tornando-os “neutros” ao campo elétrico do electrospray [84,85].

Deve-se também ressaltar a tendência de ocorrer descarga Corona quando se utiliza a interface electrospray no modo negativo. A descarga Corona resulta na ionização química do analito na fase gasosa e das moléculas do solvente que estão presentes no espaço ao redor do *spray* do capilar. Um espectro de massas obtido durante uma descarga Corona é frequentemente caracterizado por muito ruído e baixa estabilidade [84].

5 CONCLUSÕES

Os métodos desenvolvidos para a análise de etidronato, clodronato, pamidronato e alendronato em matéria-prima e produto acabado são simples e demonstraram precisão, exatidão e especificidade. Os métodos são rápidos com tempo de análise de 5 minutos para etidronato e clodronato e de 7 minutos para alendronato e pamidronato. Além disso, estes métodos empregaram detecção por ultravioleta, comumente encontrado em laboratórios analíticos. Colunas de diâmetro interno reduzido (2,0 mm) foram utilizadas, reduzindo o consumo de solvente em torno de 80% quando comparado com aquele de uma coluna convencional (4,6 mm). Colunas de sílica, mais baratas que as poliméricas empregadas em outros estudos, foram utilizadas. Além disso, a fase móvel utilizada, composta de tampão citrato, causa menos danos para o sistema cromatográfico do que o ácido nítrico, que é comumente utilizado na análise destes fármacos.

Foi possível otimizar as condições de fase móvel e vazão de gás de secagem e de nebulização para obter-se baixo ruído, tempo de análise curto e boa relação sinal/ruído para o método LC-MS empregado na determinação de alendronato e pamidronato. O planejamento fatorial empregado (2³) permitiu otimizar as condições de voltagem do capilar, voltagem do cone e energia do íon, obtendo-se a melhor resposta possível para a análise de alendronato. No entanto, o método ainda necessita ser melhorado em relação à sensibilidade, para que seja possível a análise em fluidos biológicos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] LICATA, A. A. Bisphosphonate therapy. **Am. J. Med. Sci.**, v. 313, p. 17-22, 1997.
- [2] RUSSELL, R. G. G.; ROGERS, M. J.; FRITH, J. C.; LUCKMAN, S.P.; COXON, F.P.; BENFORD, H.L.; CROUCHER, P.I.; SHIPMAN, C, FLEISCH, H. A. The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action. **J. Bone Miner. Res.**, v. 14, p. 53-65, 1999
- [3] SHINODA, H.; ADAMEK, G.; FELIX, R.; FLEISCH, H.; SCHENK, R.; HAGAN, P. Structure-activity-relationships of various bisphosphonates. **Calcif. Tissue Int.**, v. 35, p. 87-99, 1983.
- [4] FLEISCH, H. Bone and mineral metabolism. In: FLEISCH, H. (Ed.). **Bisphosphonates in bone disease: from the laboratory to the patients**. Berne: Stampfli, 1993, p. 8-24.
- [5] NEVES, M.; GANO, L.; PEREIRA, N.; COSTA, M. C.; COSTA, M. R.; CHANDIA, M.; ROSADO, M.; FAUSTO, R. Synthesis, characterization and biodistribution of bisphosphonates Sm-153 complexes: correlation with molecular modeling interaction studies. **Nucl. Med. Biol.**, v. 29, p. 329-338, 2002.
- [6] SAHNI, M.; GUENTHER, H. L.; FLEISCH, H.; COLLIN, P.; MARTIN, T. J. Bisphosphonates act on rat bone-resorption through the mediation of osteoblasts. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 2004-2011, 1993.
- [7] GREEN, J. R. Bisphosphonates: preclinical review. **The Oncologist**, v. 9, p. 3-13, 2004.
- [8] LIN, J. H. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. **Bone**, v. 18, p. 75-85, 1996.
- [9] FLEISCH, H. Bisphosphonates: mechanisms of action. **Endocrine Rev.**, v. 19, p. 80-100, 1998.
- [10] REITSMA, P. H.; BIJVOET, O.L.M.; VERLINDEN-OOMS, H.; VAN DER WEE-PALS, L.J.A. Kinetic studies of bone and mineral metabolism during treatment with (3-amino-1-hydroxy-propylidene)-1,1-bisphosphonate (APD) in rats. **Calci. Tissue Int.**, v. 32, p. 145-157, 1980.

- [11] SZAJNMAN, S. H.; BAILEY, B. N.; DOCAMPO, R.; RODRIGUEZ, J. B. Bisphosphonates derived from fatty acids are potent growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi* **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 11, p. 789-792, 2001.
- [12] MARTIN, M. B.; GRIMLEY, J. S.; LEWIS, J. C.; HEATH, H. T.; BAILEY, B. N.; KENDRICK, H.; YARDLEY, V.; CALDERA, A.; LIRA, R.; URBINA, J. A.; MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R.; CROFT, S. L.; OLDFIELD, E. Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*: a potential route to chemotherapy. **J. Med. Chem.**, v. 44, p. 909-916, 2001.
- [13] NUGENT, R. A.; MURPHY, M.; SCHLACHTER, S. T.; DUNN, C. J.; SMITH, R. J.; STAITE, N. D.; GALINET, L. A.; SHIELDS, S. K.; WU, H.; ASPAR, D. G.; RICHARD, K. A.; ROHLOFF, N. A. Pyrazoline bisphosphonate esters as novel antiinflammatory and antiarthritic agents. **J. Med. Chem.**, v. 36, p. 134-139, 1993.
- [14] NUGENT, R. A.; SCHLACHTER, S. T.; MURPHY, M.; DUNN, C. J.; STAITE, N. D.; GALINET, L. A.; SHIELDS, S. K.; WU, H.; ASPAR, D. G.; RICHARD, K. A. Carbonyl-containing bisphosphonate esters as novel antiinflammatory and antiarthritic agents. **J. Med. Chem.**, v. 37, p. 4449-4454, 1994.
- [15] KONTECKA, E. G.; SILVAGNI, R.; LIPINSKI, R.; LECOUEVEY, M.; MARINCOLA, F. C.; CRISPONI, G.; NURCHI, V. M.; LEROUX, Y.; KOZLOWSKI, H. Bisphosphonate chelating agents: complexation of Fe(III) and Al(III) by 1-phenyl-1-hydroxymethylene bisphosphonate and its analogues. **Inorg. Chim. Acta**, v. 339, p. 111-118, 2002.
- [16] RODRIGUES, J. M.; DACOSTA, J. B. N. Synthesis and characterization of new symmetrical bisphosphonates. **Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.**, v. 177, p. 137-149, 2002.
- [17] NIXON, G. A.; BUEHLER, E. V.; NEWMANN, E. A. Preliminary safety assessment of disodium etidronate as an additive to experimental oral hygiene products. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 22, p. 661, 1972.
- [18] FLORA, L.; HASSING, G. S.; CLOYD, G. G.; BEVAN, J. A.; PARFITT, A. M.; VILLANUEVA, A. R. The long-term skeletal effects of EHDP in dogs. **Metab. Bone Disease Relat. Res.**, v. 3, p. 289-300, 1981.
- [19] SINGER, F. R.; RITCH, P. S.; LAD, T. E.; RINGEBERG, Q. S.; SCHILLER, J. H. Treatment of hypercalcemia of malignancy with intravenous etidronate - a controlled, multicenter study. **Arch. Intern. Med.**, v. 151, p. 471-476, 1991.

[20] MARKKULA, R.; REPO, H.; LEIRISALO, M.; BLOMQVIST, C.; ELOMAA, I. Effect of dichloromethylene diphosphonate (CL2MDP) on immune function in breast-cancer patients with bone metastases. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 15, p. 159-161, 1983.

[21] DODWELL, D. J.; HOWELL, A.; FORD, J. Reduction in calcium excretion in women with breast-cancer and bone metastases using the oral bisphosphonate pamidronate. **Br. J. Cancer**, v. 61, p. 123-125, 1990.

[22] GIBALDI, M.; PERRIER, D. **Pharmacokinetics**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 1982. 494 p.

[23] LIN, J. H.; CHEN, I-W.; DELUNA, F. A. On the absorption of alendronate in rats. **J. Pharm Sci.**, v. 83, p. 1741-1746, 1994.

[24] RUIFROK, P. G.; MOL, W. E. M. Paracellular transport of inorganic and organic ions across the rat ileum. **Biochem. Pharmacol.**, v. 32, p. 637-640, 1983.

[25] GERTZ, B. J.; HOLLAND, S. D.; KLINE, W. F.; MATUSZEWSKI, B. K.; PORRAS, A. G. Clinical-pharmacology of alendronate sodium **Osteopor. Int.**, v. 3, suppl. 3, p. S13-S16, 1993.

[26] LIN, J. H.; CHEN, I-W.; DELUNA, F. A.; HICHENS, M. Role of calcium in plasma-protein binding and renal handling of alendronate in hypocalcemic and hypercalcemic rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 267, p. 670-675, 1993.

[27] MICHAEL, W. R.; KING, W. R.; WAKIN, J. M. Metabolism of disodium ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (disodium etidronate) in the rat, rabbit, dog and monkey. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 21, p. 503-515, 1972.

[28] WADA, H.; FERNANDO, Q. Determination of formation constants of copper(II) complexes of (hydroxyethylidene)diphosphonic acid with solid state cupric ion-selective electrode. **Anal. Chem.**, v. 43, p. 751-755, 1971.

[29] FLEISCH, H. Bisphosphonates – pharmacology and use in the treatment of tumour-induced hypercalcaemic and metastatic bone disease. **Drugs**, v. 42, p. 919-944, 1991.

[30] KIECZYKOWSKI, G. R.; JOBSON, R. B.; MELILLO, D. G.; REINHOLD, D. F.; GREND, V. J.; SHINKAI, I. Preparation of (4-amino-1-hydroxybutylidene)bisphosphonic acid sodium salt, MK-217 (alendronate sodium). An improved procedure for the preparation of 1-hydroxy-1,1-bisphosphonic acids. **J. Org. Chem.**, v. 60, p. 8310-8312, 1995.

- [31] LECOUEVEY, M.; MALLARD, I.; BAILLY, T.; BURGADA, R.; LEROUX, Y. A mild and efficient one-pot synthesis of 1-hydroxymethylene-1,1-bisphosphonic acids. Preparation of new tripod ligands. **Tetrahedron Lett.**, v. 42, p. 8475-8478, 2001.
- [32] VOGEL, A. I. **A textbook of practical organic chemistry including qualitative organic analysis**. London: Longmans, 1951. 1033 p.
- [33] ALLEN, A. J.; MANKE, D. R.; Lin, W. Synthesis of functional bisphosphonates via new palladium-catalyzed bis-hydrophosphorylation reactions. **Tetrahedron Lett.**, v. 41, p. 151-154, 2000.
- [34] MCCOMBIE, H.; SAUNDERS, B. C.; STACEY, G. J. Esters containing phosphorus.3.dialkyl iodophosphonates. **J. Chem. Soc.**, p. 921-922, 1945.
- [35] DU, Y.; JUNG, K. Y.; WIEMER, D. F. A one-flask synthesis of alpha,alpha-bisphosphonates via enolate chemistry. **Tetrahedron Lett.**, v. 43, p. 8665-8668, 2002.
- [36] MIZRAHI, D. M.; WANER, T.; SEGALL, Y. Alpha-amino acid derived bisphosphonates. Synthesis and anti-resorptive activity. **Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.**, v. 173, p. 1-25, 2001.
- [37] COUTHON, H.; GOURVÈS, J. P.; GUERVENOU, J.; CORBEL, B.; STURTZ, G. Synthesis of two novel 2-aminocyclopropylidene-1,1-bisphosphonates. **Synth. Commun.**, v. 29, p. 4251-4260, 1999.
- [38] CHESTER, T. L. Dual flame photometric phosphorus-selective detector for high-performance liquid-chromatography. **Anal. Chem.**, v. 52, p. 1621-1624, 1980.
- [39] CHESTER, T. L.; LEWIS, E. C.; BENEDICT, J. J.; SUNBERG, R. J.; TETTENHORST, W. C. Determination of (dichloromethylene)diphosphonate in physiological fluids by ion-exchange chromatography with phosphorus-selective detection. **J. Chromatogr.**, v. 225, p. 17-25, 1981.
- [40] YEH, P. Determination of methylenediphosphonic acid by ion-pairing high-pressure liquid-chromatography with refractive-index detection. **J. Chromatogr. Sci.**, v. 19, p. 27-29, 1981.
- [41] WONG, D.; JANDIK, P.; JONES, W. R.; HAGENAARS, A. Ion chromatography of polyphosphonates with direct refractive-index detection. **J. Chromatogr.**, v. 389, p. 279-285, 1987.

[42] HAN, Y-H. R.; QIN, X-Z. Determination of alendronate sodium by ion chromatography with refractive index detection. **J. Chromatogr. A**, v. 719, p. 345-352, 1996.

[43] MEEK, S. E.; PIETRZYK, D. Liquid-chromatographic separation of phosphorus oxo acids and other anions with postcolumn indirect fluorescence detection by aluminum morin. **Anal. Chem.**, v. 60, p. 1397-1400, 1988.

[44] LOVDAHL, M. J.; PIETRZYK, D. J. Anion-exchange separation and determination of bisphosphonates and related analytes by post-column indirect fluorescence detection. **J. Chromatogr. A**, v. 850, p. 143-152, 1999.

[45] KWONG, E.; CHIU, A. M. Y.; MCCLINTOCK, S. A.; COTTON, M. L. HPLC analysis of an amino bisphosphonate in pharmaceutical formulations using postcolumn derivatization and fluorescence detection. **J. Chromatogr. Sci.**, v. 28, p. 563-566, 1990.

[46] FLESCH, G.; HAUFFE, S. A. Determination of the bisphosphonate pamidronate disodium in urine by pre-column derivatization with fluorescamine, high-performance liquid-chromatography and fluorescence detection. **J. Chromatogr.**, v. 489, p. 446-451, 1989.

[47] FLESCH, G.; TOMINAGA, N.; DEGEN, P. Improved determination of the bisphosphonate pamidronate disodium in plasma and urine by precolumn derivatization with fluorescamine, high-performance liquid-chromatography and fluorescence detection. **J. Chromatogr.**, v. 568, p. 261-266, 1991.

[48] KLINE, W. F.; MATUSZEWSKI, B. K.; BAYNE, W. F. Determination of 4-amino-1-hydroxybutane-1,1-bisphosphonic acid in urine by automated precolumn derivatization with 2,3-naphthalene dicarboxyaldehyde and high-performance liquid-chromatography with fluorescence detection. **J. Chromatogr.**, v. 534, p. 139-149, 1990.

[49] KLINE, W. F.; MATUSZEWSKI, B. K. Improved determination of the bisphosphonate alendronate in human plasma and urine by automated precolumn derivatization and high-performance liquid-chromatography with fluorescence and electrochemical detection. **J. Chromatogr.**, v. 583, p. 183-193, 1992.

[50] SPARIDANS, R. W.; HARTIGH, J. D.; BEIJNEN, J. H.; VERMEIJ, P. Derivatization of pamidronate and other amino(bis)phosphonates with different isothiocyanates prior to ion-pair liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 782, p. 211-217, 1997.

[51] SPARIDANS, R. W.; HARTIGH, J. D.; BEIJNEN, J. H.; VERMEIJ, P. Determination of pamidronate in urine by ion-pair liquid chromatography after derivatization with 1-naphthylisothiocyanate. **J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.**, v. 696, p. 137-144, 1997.

- [52] SPARIDANS, R. W.; HARTIGH, J. D.; BEIJNEN, J. H.; VERMEIJ, P. Semi-automatic liquid chromatographic analysis of pamidronate in serum and citrate plasma after derivatization with 1-naphthylisothiocyanate. **J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.**, v. 705, p. 331-339, 1998.
- [53] SPARIDANS, R. W.; HARTIGH, J. D.; VERMEIJ, P. High-performance ion-exchange chromatography with in-line complexation of bisphosphonates and their quality control in pharmaceutical preparations. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 13, p. 1545-1550, 1995.
- [54] DE MARCO, J. D.; BIFFAR, S. E.; REED, D. G.; BROOKS, M. A. The determination of 4-amino-1-hydroxybutane-1,1-diphosphonic acid monosodium salt trihydrate in pharmaceutical dosage forms by high-performance liquid-chromatography. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 7, p. 1719-1727, 1989.
- [55] SPARIDANS, R. W.; HARTIGH, J. D.; RAMP-KOOPMANSCHAP, W. M.; LANGEBROEK, R. H.; VERMEIJ, P. The determination of pamidronate in pharmaceutical preparations by ion-pair liquid chromatography after derivatization with phenylisothiocyanate. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 16, p. 491-497, 1997.
- [56] DALEY-YATES, P. T.; GIFFORD, L. A.; HOGGARTH, C. R. Assay of 1-hydroxy-3-aminopropylidene-1,1-bisphosphonate and related bisphosphonates in human-urine and plasma by high-performance ion chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 490, p. 329-338, 1989.
- [57] KOSONEN, J. P. Determination of disodium clodronate in bulk material and pharmaceuticals by ion chromatography with postcolumn derivatization. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 10, p. 881-887, 1992.
- [58] VIRTANEN, V.; LAJUNEN, L. H. J. High-performance liquid-chromatographic method for simultaneous determination of clodronate and some clodronate esters. **J. Chromatogr.**, v. 617, p. 291-298, 1993.
- [59] VIRTANEN, V.; LAJUNEN, L. H. J. Determination of clodronate in aqueous-solutions by HPLC using postcolumn derivatization. **Talanta**, v. 40, p. 661-667, 1993.
- [60] TSAI, E. W.; IP, D. P.; BROOKS, M. A. Determination of etidronate disodium tablets by ion chromatography with indirect UV detection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 11, p. 513-516, 1993.
- [61] USUI, T.; WATANABE, T.; HIGUCHI, S. Determination of a new bisphosphonate, YM175, in plasma, urine and bone by high-performance liquid-chromatography with electrochemical detection. **J. Chromatogr.**, v. 584, p. 213-220, 1992.

[62] TSAI, E. W.; IP, D. P.; BROOKS, M. A. Determination of alendronate in pharmaceutical dosage formulations by ion chromatography with conductivity detection. **J. Chromatogr.**, v. 596, p. 217-224, 1992.

[63] HARTIGH, J. D.; LANGEBROEK, R.; VERMEIJ, P. Ion-exchange liquid-chromatographic analysis of bisphosphonates in pharmaceutical preparations. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 11, p. 977-983, 1993.

[64] TAYLOR, G. E. Determination of impurities in clodronic acid by anion-exchange chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 770, p. 261-271, 1997.

[65] QIN, X-Z.; TSAI, E. W.; SAKUMA, T.; IP, D. P. Ion chromatography ion-spray mass-spectrometric characterization of alendronate. **J. Chromatogr. A**, v. 686, p. 205-212, 1994.

[66] HUIKKO, K.; KOTIAHO, T.; YLI-KAUHALUOMA, J.; KOSTIAINEN, R. Electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry of clodronate and related bisphosphonate and phosphonate compounds. **J. Mass Spectrom.**, v. 37, p. 197-208, 2002.

[67] ISMAIL, Z.; ALDOUS, S.; TRIGGS, E. J.; SMITHURST, B. A.; BARRY, H. D. Gas-chromatographic analysis of didronel tablets. **J. Chromatogr.**, v. 404, p. 372-377, 1987.

[68] AURIOLA S.; KOSTIAINEN, R.; YLINEN, M.; MÖNKKONEN, J.; YLITALO, P. Analysis of (dichloromethylene) bisphosphonate in urine by capillary gas-chromatography mass-spectrometry. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 7, p. 1623-1629, 1989.

[69] SAKYIAMA, N.; KATAOKA, H.; MAKITA, M. Gas chromatographic analysis of 3-amino-1-hydroxypropylidene-1,1-bisphosphonate and related bisphosphonate as their N-isobutoxycarbonyl methyl ester derivatives. **J. Chromatogr. A**, v. 724, p. 279-284, 1996.

[70] ZELLER, M.; KESSLER, R.; MANZ, H. J.; SZÉKELY, G. Determination of disodium 3-amino-1-hydroxypropylidene-1,1-bisphosphonate pentahydrate. **J. Chromatogr.**, v. 545, p. 421-425, 1991.

[71] TSAI, E. W.; SINGH, M. M.; LU, H. H.; IP, D. P.; BROOKS, M. A. Application of capillary electrophoresis to pharmaceutical analysis: determination of alendronate in dosage forms. **J. Chromatogr.**, v. 626, p. 245-250, 1992.

- [72] SIRÉN, H.; MÄÄTTÄNEN, A.; RIEKKOLA, M. L. Determination of small anions by capillary electrophoresis using indirect UV detection with sulphonated nitrosonaphthol dyes. **J. Chromatogr. A**, v. 767, p. 293-301, 1997.
- [73] PENG, S. X.; TAKIGIKU, R.; BURTON, D. E.; POWELL, L. L. Direct pharmaceutical analysis of bisphosphonates by capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.**, v. 709, p. 157-160, 1998.
- [74] HUIKKO, K.; KOSTIAINEN, R. Analysis of bisphosphonates by capillary electrophoresis–electrospray ionization mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 872, p. 289-298, 2000.
- [75] HUIKKO, K.; KOSTIAINEN, R. Development and validation of a capillary zone electrophoretic method for the determination of bisphosphonate and phosphonate impurities in clodronate. **J. Chromatogr. A**, v. 893, p. 411-420, 2000.
- [76] REED, D. G.; MARTIN, G. P.; KONIECZNY, J. M.; BROOKS, M. A. The determination of alendronate sodium in tablets by inductively coupled plasma (ICP). **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 13, p. 1055-1058, 1995.
- [77] KOVACEVIC, M.; GARTNER, A.; NOVIC, M. Determination of bisphosphonate by ion chromatography-inductively coupled mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1039, p. 77-82, 2004.
- [78] JIANG, Y.; XIE, Z. Determination of ibandronate and its degradation products by ion-pair RP LC with evaporative light-scattering detection. **Chromatographia**, v. 62, p. 257-261, 2005.
- [79] XIE, Z.; JIANG, Y.; ZHANG, D. Simple analysis of four bisphosphonates simultaneously by reverse phase liquid chromatography using n-amylamine as volatile ion-pairing agent. **J. Chromatogr. A**, v. 1104, p. 173-178, 2006.
- [80] KULJANIN, J.; JANCOVIC, I.; NENDELJKOVIC, J.; PRSTOJEVIC, D.; MARINKOVIC, V. Spectrophotometric determination of alendronate in pharmaceutical formulations via complex formation with Fe(III) ions. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 28, p. 1215-1220, 2002.
- [81] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Topic Q2B: Validation of analytical procedures: methodology**. Geneva: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1996 10 p.

[82] MICHIGAMI, Y.; YAMAMOTO, Y. Behaviour of the system peak in ion chromatography with indirect ultraviolet absorption detection and trimellitate as eluent. **J. Chromatogr.**, v. 623, p. 148-152, 1992.

[83] CECH, N.B.; ENKE, C.G. Practical implications of some studies in electrospray ionisation fundamentals. **Mass Spectrom. Reviews**, v. 20, p. 362-387, 2001.

[84] DÜLCKS, T.; JURASCHECK, R. Electrospray as an ionisation method for mass spectrometry. **J. Aerosol Sci.**, v. 30, p. 927-943, 1999.

[85] KUHLMANN, F.E.; APFFEL, A.; FISCHER, S.M.; GOLDBERG, G.; GOODLEY, P. Signal enhancement for gradient reverse-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry analysis with trifluoroacetic acid and other strong acid modifiers by postcolumn addition of propionic acid and isopropanol. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 6, p. 1221-1225, 1995.

CONCLUSÃO GERAL

A utilização de duas diferentes técnicas de preparo de amostras para a determinação de fluoxetina em plasma permitiu avaliar as vantagens e desvantagens de cada uma delas. A SPME apresenta a vantagem de existirem diferentes fases extratoras disponíveis comercialmente. Materiais apolares e polares estão disponíveis, o que é fundamental para a eficiência de extração de um dado composto. Além disso, o desenvolvimento de uma interface que permite a dessorção *on-line* com aquecimento dos analitos no instrumento cromatográfico permitiu o aumento da sensibilidade do método. As desvantagens da técnica são a fragilidade da fibra SPME e a possibilidade de adsorção dos analitos nas superfícies da barra de agitação e do frasco de extração, além do baixo rendimento do processo de extração.

A SBSE possui a grande vantagem de empregar um volume grande de fase extratora, o que leva a uma extração mais eficiente. Além disso, as barras são mais resistentes do que as fibras SPME. No entanto, apenas um tipo de material extrator está disponível no mercado. Assim, para compostos de elevada polaridade, torna-se difícil obter uma adequada extração com o PDMS, uma fase muito apolar. No momento, novos materiais, tais como poliuretana, poliuretana modificada com Carboxen, PDMS modificado com Carboxen, PDMS modificado com Carbowax, PDMS modificado com OV-25 (fenilmetildifenil, 75% fenil), entre outras, têm sido avaliados no nosso laboratório, objetivando o aumento da eficiência de extração para compostos polares. Uma outra desvantagem da técnica é a necessidade de realizar a etapa de dessorção no modo *off-line*, o que reduz a sensibilidade do método. Uma interface, similar àquela descrita para o acoplamento SPME-LC, foi desenvolvida no Laboratório de Cromatografia, o que deve aumentar a eficiência dos métodos que empregam a técnica SBSE-LC.

Uma comparação da sensibilidade obtida com as técnicas SPME-LC e SBSE-LC não foi possível, pois foram utilizadas fases extratoras e sistemas de detecção diferentes. Além disso, no método SPME-LC todos o analito dessorvido foi injetado no sistema cromatográfico, enquanto que no método SBSE-LC apenas uma parte foi injetada. No entanto, a recuperação com SBSE foi muito maior (em torno de 60%) do que aquela obtida com SPME (em torno de 5%), o que já era esperado, devido ao maior volume de fase extratora. Quando se comparou as técnicas SBSE-GC-MS e SBSE-LC-MS observou-se que a primeira apresenta uma sensibilidade muito maior, principalmente quando se utiliza dessorção térmica, sendo um sistema útil para a análise de traços.

Os métodos desenvolvidos para a análise de bisfosfonatos em matéria-prima e produto acabado se mostraram adequados. Por outro lado, algumas dificuldades foram encontradas para a determinação destes compostos em fluidos biológicos. Em primeiro lugar, a concentração destes compostos no sangue é muito baixa, próximo a 1 ng mL^{-1} , o que exige o desenvolvimento de um método com elevada sensibilidade. Em segundo lugar, devido às características físico-químicas destes fármacos foi necessário o emprego de cromatografia iônica, com fase móvel constituída apenas de tampão, o que é muito prejudicial à detecção no MS. Além disso, não foi obtida uma linearidade adequada mesmo em concentrações mais elevadas, o que pode ser causado pela complexação dos analitos com metais no sistema cromatográfico. Novos estudos devem ser realizados objetivando o desenvolvimento de um método mais sensível para a análise destes fármacos em meio biológico, ou o emprego de uma técnica de extração que permita a concentração dos analitos antes da introdução no sistema cromatográfico.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO

Artigos completos publicados em periódicos

1. FERNANDES, C., SANTOS NETO, A. J., RODRIGUES, J.C., ALVES, C., LANÇAS, F.M.

Solid-phase microextraction-liquid chromatography (SPME-LC) determination of fluoxetine and norfluoxetine in plasma using a heated liquid flow through interface. Journal of Chromatography B, 2006 - in press.

2. FERNANDES, C., JIAYU, P., SANDRA, P., LANÇAS, F.M.

Stir bar sorptive extraction-liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of fluoxetine in plasma. Chromatographia (Wiesbaden), 2006 - in press.

3. FERNANDES, C., JUNQUEIRA, R. G., MOREIRA CAMPOS, L.M., PIANETTI, G.A.

Dissolution test for lamivudine tablets: optimization and statistical analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.42, p.601 - 606, 2006.

4. SANTOS NETO, A.J., RODRIGUES, J.C., FERNANDES, C., TITATO, G.M., ALVES, C., LANÇAS, F.M.

Automated microcolumn-switching system for drug analysis by direct injection of human plasma. Journal of Chromatography A, v.1105, p.71 - 76, 2006.

5. RODRIGUES, J.C., SANTOS NETO, A.J., FERNANDES, C., ALVES, C., CONTADORI, A., LANÇAS, F.M.

Development of an improved heated interface for coupling solid-phase microextraction to high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, v.1105, p.208 - 212, 2006.

6. ALVES, C., FERNANDES, C., SANTOS NETO, A.J., RODRIGUES, J.C., NASSUR, M.E.Q., LANÇAS, F.M.

Optimization of the SPME parameters and its on-line coupling with HPLC for the determination of tricyclic antidepressants in plasma samples. Journal of Chromatographic Science, v.44, p.340 - 346, 2006.

7. FERNANDES, C., LEITE, R.S., LANÇAS, F.M.

Rapid determination of bisphosphonates by ion chromatography with indirect ultraviolet detection. Journal of Chromatographic Science. Aceito para publicação.

8. FERNANDES, C., LEITE, R.S., LANÇAS, F.M.

Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. Química Nova, v.28, p.274 - 280, 2005.

Artigos submetidos

1. FERNANDES, C., VAN HOECK, E., SANDRA, P., LANÇAS, F.M.

Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization for the determination of fluoxetine in plasma. Journal of Separation Science.

2. ALVES, C., SANTOS NETO, A.J., FERNANDES, C., RODRIGUES, J.C., LANÇAS, F.M.

A novel approach for analysis of tricyclic antidepressive drugs in plasma using SPME-LC-MS. Journal of Mass Spectrometry.

3. SANTOS NETO, A.J., FERNANDES, C., RODRIGUES, J.C., ALVES, C., LANÇAS, F.M.

Fluoxetine analysis by direct injection of human plasma in a column switching liquid chromatographic system. Journal of Separation Science.

Formação complementar

2005 - 2005 Extensão universitária em Estágio de doutorando (sanduíche).

Universiteit Gent, UGENT, Bélgica

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Revisor de periódico

1 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (0731-7085)

Vínculo: 2006 -

Comunicações e resumos publicados em anais de congressos

1. RODRIGUES, B. T., SANTOS NETO, A.J., FERNANDES, C., ALVES, C., LANÇAS, F.M.

Avaliação de diferentes estratégias para a análise de albendazol e metabólitos em plasma bovino por cromatografia líquida com acoplamento de colunas ("column switching") In: SIMCRO 2006, São Pedro. Livro de Resumos p.173 - 173.

2. RODRIGUES, B. T., SANTOS NETO, A.J., FERNANDES, C., ALVES, C., LANÇAS, F.M.

Cromatografia líquida multidimensional para análise de albendazol e metabólitos em plasma bovino utilizando injeção direta de amostra In: SIMCRO 2006, São Pedro. Livro de Resumos p.193 - 193.

3. FERNANDES, C., HOECK, E. V., JIAYU, P., SANDRA, P., LANÇAS, F.M.
SBSE-GC-MS X SBSE-LC-MS: técnicas modernas para a análise de fluoxetina em plasma In: SIMCRO 2006, São Pedro. Livro de Resumos p.189 – 189.
4. FERNANDES, C., SANTOS NETO, A.J., RODRIGUES, J.C., ALVES, C., LANÇAS, F.M. SPME-LC empregando interface homemade com sistema de aquecimento - aplicação na análise de fluoxetina e norfluoxetina em plasma In: SIMCRO 2006, São Pedro. Livro de resumos p.190 – 190.
5. SANTOS NETO, A. J., RODRIGUES, B. T., Jose Carlos Rodrigues, FERNANDES, C., Claudete Alves, Lanças, F.M.
Direct injection of bovine plasma using multidimensional liquid chromatography: analysis of albendazole and metabolites In: XI Congreso Latinoamericano de Cromatografía e Ciencias Afines, 2006, Mérida.
6. Claudete Alves, GOMES, P. L., FERNANDES, C., SANTOS NETO, A. J., Jose Carlos Rodrigues, Lanças, F.M.
Methodology validation for analysis of antiepileptic drugs in plasma using solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography (SPME-LC) In: XI Congreso Latinoamericano de Cromatografía e Ciencias Afines, 2006, Mérida.
7. FERNANDES, C., HOECK, E. V., SANDRA, P., Lanças, F.M.
Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization for the determination of fluoxetine in plasma In: XI Congreso Latinoamericano de Cromatografía e Ciencias Afines, 2006, Mérida.
8. FERNANDES, C., JIAYU, P., SANDRA, P., Lanças, F.M.
Stir bar sorptive extraction-liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of fluoxetine in plasma In: XI Congreso Latinoamericano de Cromatografía e Ciencias Afines, 2006, Mérida.
9. Claudete Alves, SANTOS NETO, A. J., Jose Carlos Rodrigues, FERNANDES, C., NASSUR, M. E. Q., Lanças, F.M.
Acoplamento SPME-LC/MS para análise de fármacos antidepressivos tricíclicos em plasma In: 1 Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas - 2005, Campinas/SP. CD de Resumos 1 BrMass.
10. SANTOS NETO, A. J., Claudete Alves, FERNANDES, C., Jose Carlos Rodrigues, Lanças, F.M.
Utilização de planejamento fatorial para otimização das condições de ionização de antidepressivos tricíclicos em acoplamento LC-MS In: 1 Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas 2005, Campinas/SP. CD de Resumos 1 BrMass.

11. SANTOS NETO, A. J., FERNANDES, C., Claudete Alves, Jose Carlos Rodrigues, Lanças, F.M.

Análise automatizada de fármacos e drogas de abuso em fluidos biológicos por cromatografia líquida multidimensional com injeção direta de plasma In: XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2005, Recife. Anais do XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia.

12. Jose Carlos Rodrigues, Claudete Alves, SANTOS NETO, A. J., FERNANDES, C., CONTADORI, A., Lanças, F.M.

Avaliação da dessorção térmica em interface aquecida para SPME-HPLC na análise de antidepressivos tricíclicos e fluoxetina In: XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2005, Recife. Anais do XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia.

13. FERNANDES, C., SANTOS NETO, A. J., Jose Carlos Rodrigues, Claudete Alves, Lanças, F.M.

Determinação de fluoxetina em plasma empregando microextração em fase sólida acoplada a cromatografia líquida (SPME-LC) com interface homemade aquecida In: XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2005, Recife. Anais do XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia.

14. Claudete Alves, SANTOS NETO, A. J., FERNANDES, C., Jose Carlos Rodrigues, Lanças, F.M.

Otimização dos parâmetros que influenciam na ionização de fármacos anticonvulsivantes em acoplamento LC-MS utilizando planejamento fatorial In: XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2005, Recife. Anais do XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia.

15. Claudete Alves, Jose Carlos Rodrigues, SANTOS NETO, A. J., FERNANDES, C., NASSUR, M. E. Q., Lanças, F.M.

Otimização da análise de fármacos anticonvulsivantes por microextração em fase sólida acoplada a cromatografia líquida empregando interface aquecida desenvolvida no laboratório In: 13º Encontro Nacional de Química Analítica, 2005, Niterói/RJ. CD de Resumos - 13º ENQA.

16. Leite, R.S., FERNANDES, C., Lanças, F.M.

Otimização das condições cromatográficas para determinação de etidronato em urina por HPLC In: 13º Encontro Nacional de Química Analítica, 2005, Niterói/RJ. CD de Resumos - 13º ENQA.

17. FERNANDES, C., SANTOS NETO, A. J., Jose Carlos Rodrigues, Claudete Alves, Lanças, F.M.

Otimização das condições da microextração em fase sólida (SPME) para a determinação de fluoxetina em plasma In: 13º Encontro Nacional de Química Analítica, 2005, Niterói/RJ. CD de Resumos - 13º ENQA.

- 18.** SANTOS NETO, A. J., Claudete Alves, FERNANDES, C., Jose Carlos Rodrigues, Guilherme Miola Titato, Lanças, F.M.
Cromatografia líquida capilar multidimensional com injeção direta de amostra para a determinação de fluoxetina em plasma In: 13° Encontro Nacional de Química Analítica, 2005, Niterói. CD de Resumos - 13° ENQA.
- 19.** FERNANDES, C., SANTOS NETO, A. J., SILVA, J. C., Lanças, F.M.
Determinação automatizada de fluoxetina em plasma por cromatografia líquida multidimensional In: 28° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas. Livro de Resumos p. QA150 - QA150.
- 20.** FERNANDES, C., Leite, R.S., Lanças, F.M.
Determinação rápida de bisfosfonatos em medicamentos: desenvolvimento e validação de método In: 28° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas. Livro de Resumos p. QA043 - QA043.
- 21.** SANTOS NETO, A. J., Claudete Alves, FERNANDES, C., Jose Carlos Rodrigues, Lanças, F.M.
Preparo de amostra on-line para análise de fármacos em plasma por injeção direta em cromatografia líquida multidimensional In: Extech 2005 - 7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies, 2005, Campinas/SP. CD de Resumos Extech.
- 22.** Claudete Alves, SANTOS NETO, A. J., Jose Carlos Rodrigues, FERNANDES, C., NASSUR, M. E. Q., Lanças, F.M.
Validação de metodologia para análise de fármacos antidepressivos tricíclicos em plasma por SPME-LC/MS In: Extech 2005 - 7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies, 2005, Campinas/SP. CD de Resumos Extech.
- 23.** FERNANDES, C., SANTOS NETO, A. J., SILVA, J. C., Lanças, F.M., NASSUR, M. E. Q.
Determinação de fluoxetina utilizando SPME-LC: "on-line" versus "off-line" In: Tenth Latin American Congress On Chromatography and Related Techniques, 2004, Campos do Jordão. Book of Abstracts p. 208 - 208.
- 24.** FERNANDES, C., Leite, R.S., Lanças, F.M.
Determinação rápida de bisfosfonatos utilizando cromatografia de troca aniônica em sílica modificada e detecção indireta no UV In: Tenth Latin American Congress On Chromatography and Related Techniques, 2004, Campos do Jordão. Book of Abstracts p. 211 - 211.
- 25.** FERNANDES, C., Leite, R.S., Lanças, F.M.
Análise de clodronato por cromatografia líquida de alta eficiência via complexação com íons Fe(III) In: 12 Encontro Nacional de Química Analítica, 2003, São Luís. Química Analítica Moderna: uma contribuição para a química limpa.

Ministração de cursos

1. FERNANDES, C.

SIMCRO 2006 - Cromatografia Líquida Multidimensional - MS (LC-LC/MS).
Instrumentação. Aplicações na área farmacêutica, 2006.

2. FERNANDES, C.

Tenth Latin American Congress On Chromatography and Related Techniques -
Extração com solventes, 2004.

Participação em eventos

1. II Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins - SIMCRO 2006, 2006.
(Participações em eventos/Simpósio)

2. 28 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005. (Participações em
eventos/Congresso)

3. Tenth Latin American Congress On Chromatography and Related Techniques,
2004. (Participações em eventos/Congresso)

4. 12 Encontro Nacional de Química Analítica, 2003. (Participações em
eventos/Congresso)