CLAUDETE ALVES

**“ANÁLISE DE FÁRMACOS EM FLUIDOS
BIOLÓGICOS EMPREGANDO O ACOPLAMENTO
SPME-LC/MS”**

Tese Apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos da Universidade de São Paulo
para Obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Química Analítica).

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

São Carlos

2006

Ele é o meu Senhor,
Ele é o Rei dos Reis
Ele é o Pai de Amor
Poderoso Deus
É o Emanuel
É o grande Eu Sou
Ele é o Cordeiro
Que me salvou
Ele vivo está
Ele ressurgiu
Sempre reinará
Sempre existiu
Ele é o Alfa, o Ômega
O início e o fim
Salvador e Messias
Amigo para mim
Príncipe da Paz
Só por Ele eu viverei

(Michael W. Smith)

Dedico este trabalho a Deus.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por estar presente em todos os momentos da minha vida.

Ao Henrique Alves, meu filho, meu presente enviado por Deus por dar um novo sentido a minha vida.

Aos meus pais, Antonio e Maria Rita, pelo seu amor e por estarem sempre presentes em todas as etapas de minha vida.

À Cláudia e Luciano, meus irmãos, pela compreensão, paciência e grande amizade e ao meu cunhado, **Jason**, pelo apoio constante.

Ao Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças, por permitir a realização deste trabalho; colaborando com sua experiência e orientação.

À FAPESP pelo apoio financeiro e a bolsa concedida.

Ao Prof. Dr. Emanuel Carrilho, por sua amizade e colaborar na minha formação.

À Profa. Dra. Maria Eugênia Costa Queiroz, por ter concedido uma parte dos padrões utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Janete Harumi Yariwake e ao Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari, pelas valiosas sugestões durante o exame de qualificação.

À Fernanda, por sua amizade imensa e por me ensinar com sua simplicidade.

À Ana Valéria, pela amizade, apoio e cumplicidade.

Aos amigos, Renata, Mônica, Márcia, Jorge, Gláucio e Marcos, pela amizade.

Ao Alvaro e Christian, pela colaboração valiosa durante todo meu doutorado.

Ao Dr. José Carlos Rodrigues, pelo desenvolvimento da interface utilizada neste trabalho e por sua amizade.

Ao Luís, pela fabricação das fibras *lab-made* utilizadas neste trabalho.

À Cristina Lacerda, pela amizade e pelas fibras de SPME.

Ao Alexandre Cruz pela amizade e por ser sempre tão solícito, auxiliando-me nos momentos em que mais precisei.

Á Odete, Elaine, pela amizade, compreensão e pela colaboração no desenvolvimento do meu trabalho.

*Aos amigos e colegas do **Croma**, Sheila, Gabriela, Ariane, Bruna, Célia, Maribel, Regiane, Alessandra, Roselene, Karina F., Karina L., Juliana, Adriana, Nilson, Rodrigo, Rogério, Marcelo, Wendell, Evandro, Guilherme, Esmeraldo, Daniel, Leandro, Luis Henrique, Renê, Sidnei, Lincon, Igor, Vitor, Marcos e Alcimar (pelos churrascos maravilhosos).*

*Aos ex-alunos do **Croma**, pelo companheirismo e ambiente agradável de trabalho.*

As bibliotecárias do IQSC: Lia, Wilneide, Sônia, Vitória, Elaine e Solange, pela paciência e disposição em ajudar.

A Silvia e Andréia da seção de pós-graduação, pela atenção dispensada durante todos estes anos.

Aos funcionários da oficina mecânica, em especial aos Alex.

À CAPES E CNPq, pelo suporte financeiro.

RESUMO

Os métodos convencionais para a determinação de fármacos em fluidos biológicos baseiam-se em técnicas cromatográficas e imunoquímicas. O tratamento prévio de amostras biológicas, o qual abrange as etapas de extração, pré-concentração e “clean-up”, tem sido requerido nas análises de fármacos, para aumentar a sensibilidade e seletividade analítica. No entanto, nos últimos anos, com o avanço da instrumentação, diversas técnicas têm sido avaliadas para a análise de diferentes fármacos em fluidos biológicos, destacando-se entre elas a Microextração em Fase Sólida (SPME) e a Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC/MS). A SPME apresenta uma série de vantagens em relação às técnicas de extração convencionais (Soxhlet, LLE e SPE), ou seja: não requer instrumentação analítica sofisticada, não utiliza solvente orgânico, permite automação das análises, a reutilização das fibras extratoras e integra em um único sistema, a extração, concentração e introdução da amostra no sistema cromatográfico. Neste trabalho, foi desenvolvida uma interface versátil e de baixo custo, que permite o acoplamento das técnicas SPME-LC/MS para análise dos fármacos antidepressivos tricíclicos e anticonvulsivantes. O planejamento fatorial empregado no desenvolvimento das metodologias mostrou ser uma ferramenta estatística simples de grande importância. Foram obtidas mais informações com um número menor de experimentos, avaliando não só os efeitos principais como os efeitos de interação de todas as variáveis nas respostas. As condições cromatográficas otimizadas foram adequadas para a análise por LC/MS. Os níveis de detecção alcançados ressaltam a importância e destaque das técnicas HPLC e LC/MS. O método desenvolvido, tanto para os fármacos antidepressivos tricíclicos como para os anticonvulsivantes, apresentou especificidade, precisão, linearidade e limite de quantificação aceitável para a análise.

ABSTRACT

Conventional methods used for the determination of drugs in biological fluids are based on chromatographic and immunochemical techniques. The biological samples treatment - which includes extraction, pre-concentration and clean up steps – has been required in drugs analysis in order to increase both analytical sensitivity and selectivity. Nevertheless, lately, within the advancements in instrumentation, different techniques have been evaluated for the analysis of different drugs in biological fluids, such as: solid phase microextraction (SPME) and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC/MS). SPME presents many advantages towards the conventional extraction techniques (soxhlet, LLE and SPE), which include: use of simple analytical instrumentation, analysis automation, reuse of extractor fibers and integration of extraction, concentration and sample introduction in the same chromatographic system. In this work, a versatile and low cost interface was developed, which allows the coupling of SPME-LC/MS techniques to tricyclic antidepressants and anticonvulsant drugs analysis. The employed factorial design has shown to be a simple and useful statistical tool. With this device more information could be obtained with fewer experiments by evaluating not only the main interaction effects but also the interaction effects of all variables on the results. The optimized chromatographic conditions were adequate for LC/MS analysis. The obtained detection levels highlight the importance of high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC/MS). The developed method, for both tricyclic antidepressants and anticonvulsant drugs, has presented specificity, accuracy, linearity and adequate limit of detection for this analysis.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

- Figura 2.1** - Cromatogramas para os ACVs em colunas C_8 (a) e C_{18} (b), utilizando como fase móvel tampão fosfato de potássio (100 mmol L^{-1})/ACN/MeOH (64:19:17 v/v/v). (1) primidona, (2) lamotrigina, (3) fenobarbital, (4) epóxi-cabamazepina, (5) fenitoína e (6) carbamazepina 23
- Figura 2.2** - Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação dos ACVs: (a) água/ACN (70:30), (b) tampão acetato de sódio (100 mmol L^{-1})/ACN (50:50 v/v) e (c) tampão fosfato de potássio (100 mmol L^{-1})/ACN/MeOH 64:19:17 v/v/v). (1) primidona, (2) lamotrigina, (3) fenobarbital, (4) epóxi-cabamazepina, (5) fenitoína e (6) carbamazepina. 25
- Figura 2.3** - Cromatograma típico obtido para os ACVs em diferentes valores de pH do tampão fosfato de potássio (a) pH 5,5, (b) pH 6,5 e (c) pH 7,5 /ACN/MeOH (64:19:17). (1) primidona, (2) lamotrigina, (3) fenobarbital, (4) epóxi-cabamazepina, (5) fenitoína e (6) carbamazepina. 27
- Figura 2.4** - Cromatogramas de uma mistura de antidepressivos das colunas C_8 (a) e C_{18} (b), utilizando como fase móvel tampão acetato de amônio 100 mmol L^{-1} (pH 5,50)/ACN. (1) desipramina, (2) imipramina, (3) nortriptilina, (4) imitriptilina e (5) clomipramina. 29
- Figura 2.5** - Cromatogramas dos testes das fases móveis (100 mmol L^{-1}) e pH 5,50: (a) tampão fosfato de potássio/ACN (50:50), (b) tampão acetato de sódio/ACN (50:50) e (c) tampão acetato de amônio/ACN (50:50) ambos contendo 0,05 % de trietilamina. (1) desipramina, (2) imipramina, (3) nortriptilina, (4) imitriptilina e (5) clomipramina. 31
- Figura 2.6** - Cromatogramas típicos obtidos para os ADTs em diferentes pH com tampão acetato de amônio (100 mmol L^{-1}): (a) pH 5,50 e (b) pH 4,50. (1) desipramina, (2) imipramina, (3) nortriptilina, (4) imitriptilina e (5) clomipramina. 33

Capítulo 3

- Figura 3.1** - Dispositivo comercial utilizado na SPME 41
- Figura 3.2** - Modos de extração com SPME; (a) extração direta e (b) modo headspace. 43
- Figura 3.3** - Planejamento em estrela para duas variáveis 52
- Figura 3.4** - Desenho em 3D do corpo da câmara de dessorção. 63
- Figura 3.5** - Fotografia da interface SPME-LC. 64
- Figura 3.6** - Módulo da interface SPME-LC interligada ao sistema cromatográfico. 64
- Figura 3.7** - Diagrama esquemático da interface com aquecimento SPME-LC. 66
- Figura 3.8** - Fotografia da interface SPME-LC com aquecimento. 66

Figura 3.9 - Fotografia da interface SPME-LC com aquecimento, interface aberta mostrando a câmara de dessorção.	67
Figura 3.10 - Módulo da interface SPME-LC com aquecimento interligado ao sistema cromatográfico.	67
Figura 3.11 - Diagrama esquemático da válvula de 6 vias mostrando: (A) modo de dessorção estático e (B) modo de injeção.	68
Figura 3.12 - Cromatogramas sobrepostos dos padrões de ADTs obtidos no cromatógrafo líquido LC-10 ^A , injetados através de auto-injetor (vermelho) e através da interface (preto). 1) desipramina, 2) nortriptilina, 3) imipramina, 4) amitriptilina e 5) clomopramina (padrão interno).	70
Figura 3.13 - Cromatograma dos fármacos ADTs obtidos com temperatura de dessorção ambiente e a 50 °C utilizando a interface "labmade": 1) desipramina, 2) nortriptilina, 3) imipramina, 4) amitriptilina e 5) clomipramina (padrão interno).	72
Figura 3.14 - Cromatogramas dos fármacos ACVs obtidos com temperatura de dessorção a 40 °C, 50 °C e 60 °C utilizando a interface "labmade": 1) fenobarbital, 2) epóxido-carbamazepina, 3) fenitoína e 4) carbamazepina.	73
Figura 3.15 - Áreas dos picos cromatográficos para os ADTs obtidas com diferentes recobrimentos.	75
Figura 3.16 - Diagrama de Pareto para os efeitos estimados das variáveis e suas interações para o planejamento fatorial 2 ³ + ponto central para a DESI gerado através do software STATISTICA 6.0.	78
Figura 3.17 - Superfícies de resposta para os ADTs na concentração de 1,0 µg mL ⁻¹ do planejamento fatorial 2 ³ + ponto central: a) efeitos do tempo e da temperatura para o pH 11, b) efeitos do pH e da temperatura para o tempo de 45 minutos, c) efeitos do pH e do tempo para a temperatura de 30 °C.	80
Figura 3.18 - Gráfico do perfil de resposta gerado pelo software STATISTICA envolvendo todos os ADTs para as condições otimizadas.	83
Figura 3.19 - Cromatograma dos ADTs utilizando a SPME no modo "on-line" na concentração de 1 µg mL ⁻¹ : (1) desipramina, (2) nortriptilina, (3) imipramina, (4) amitriptilina, (PI) clomipramina	83
Figura 3.20 - Eficiência de extração expressa pela área dos picos ADTs para as fibras "labmade".	85
Figura 3.21 - Plano de resposta para os ADTs da SPME para otimização da resposta (área dos picos) com a fibra C ₁₈ : a) efeito do tempo com a temperatura, b) efeito do pH, da temperatura e do tempo, c) efeito do sal, da temperatura, do tempo e do pH.	88
Figura 3.22 - Cromatograma obtido nas condições para SPME, da mistura dos ADTs, na concentração de 1,0 µg mL ⁻¹ , em plasma. Fibra "lab made" C ₁₈ (10µm – diâmetro da partícula), tempo de extração (30 min.), temperatura (30 °C), tampão carbonato de sódio 60 mmol L ⁻¹ (pH 10) e com agitação de 1200 rpm. 1) desipramina, 2) nortriptilina, 3) imipramina, 4) amitriptilina e 5) clomopramina (padrão interno)..	88
Figura 3.23 - Eficiência de extração expressada pela área dos picos para os ACVs.	91

Figura 3.24 - Superfícies de respostas para os ACVs obtidos com a SPME para otimização da resposta (área dos picos) com a fibra PDMS/DVB (60 μm): (a) efeito do tempo com a temperatura, (b) efeito do pH com a temperatura, (c) efeito do pH com o tempo, (d) efeito do eletrólito (NaCl) com a temperatura, (e) efeito do eletrólito com o tempo e (f) efeito do eletrólito com o pH.	93
Figura 3.22 - Gráfico do perfil de resposta gerado pelo software STATISTICA envolvendo os ACVs fenobarbital, fenitoína, carbamazepina e epóxido-carbamazepina para as condições otimizadas.	95
Figura 3.23 - Cromatograma ilustrando uma extração obtida com o acoplamento SPME/LC, da mistura dos fármacos ACVs, na concentração de 10 mg L^{-1} , em plasma. Fibra de PDMS/DVB (60 μm), tempo de extração (30 min.), temperatura (30 $^{\circ}\text{C}$), tampão fosfato de potássio 60 mmol L^{-1} (pH 5,0), adição de NaCl (30 %) e com agitação de 1200 rpm. 1) fenobarbital; 2) epóxido-carbamazepina; 3) fenitoína; 4) carbamazepina; 5) hidantoína (padrão interno).	95

Capítulo 4

Figura 4.1 - Diagrama esquemático da interface APCI (Ionização Química à Pressão Atmosférica).	102
Figura 4.2 - Diagrama esquemático do mecanismo de funcionamento ESI-LC/MS.	104
Figura 4.3 - Esquema ilustrativo de um analisador do tipo quadrupolo.	106
Figura 4.4 - Esquema ilustrativo de um analisador do tipo “ion trap”.	108
Figura 4.5 - Esquema ilustrativo de um analisador do tipo “tempo de voo”.	109
Figura 4.6 - Espectro de massas (LC/MS- ESI) obtido para a DESI (SCAN) na concentração de (0,5 mg L^{-1}).	117
Figura 4.7 - Espectro de massas (LC/MS- ESI) obtido para a NOR (SCAN) na concentração de (0,5 mg L^{-1}).	118
Figura 4.8 - Espectro de massas (LC/MS- ESI) obtido para a IMI (SCAN) na concentração de (0,5 mg L^{-1}).	118
Figura 4.9 - Espectro de massas (LC/MS- ESI) obtido para a AMI (SCAN) na concentração de (0,5 mg L^{-1}).	119
Figura 4.10 - Espectro de massas (LC/MS- ESI) obtido para a CLOMI (SCAN) na concentração de (0,5 mg L^{-1}).	119
Figura 4.11 - Diagrama de Pareto para os efeitos estimados das variáveis e suas interações para o planejamento fatorial 2^3 ,+ ponto central e configuração estrela para os ADTs gerado através do software STATISTICA 6.0.	123
Figura 4.12 - Superfícies de resposta para os ADTs utilizando a interface ESI no modo do íon positivo na concentração de 0,5 mg L^{-1} : a) efeitos do capilar e da temperatura para a voltagem do cone de 14 V, b) efeitos da voltagem do cone e voltagem do capilar para a temperatura de 100 $^{\circ}\text{C}$ c) efeitos da voltagem do cone e da temperatura para a voltagem capilar de 1,32 kV.	125

Figura 4.13 - Gráfico do perfil de resposta gerado pelo software STATISTICA envolvendo os ADTs para as condições otimizadas.	127
Figura 4.14 - Cromatograma do íon total obtido com a interface ESI, no modo de ionização positivo para os antidepressivos na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. (1) desipramina, (2) nortriptilina, (3) imipramina, (4) amitriptilina e (5) clomipramina.	128
Figura 4.15 - Espectro de massas LC/MS-ESI (SCAN) no modo do íon positivo obtido para a primidona na concentração de (3 mg L^{-1}) .	130
Figura 4.16 - Espectro de massas LC/MS-ESI (SCAN) no modo do íon negativo obtido para a fenobarbital na concentração de $(0,5 \text{ mg L}^{-1})$.	131
Figura 4.17 - Espectro de massas LC/MS-ESI (SCAN) no modo do íon positivo obtido para a 10,11 epóxido carbamazepina na concentração de $(0,5 \text{ mg L}^{-1})$.	131
Figura 4.18 - Espectro de massas LC/MS-ESI (SCAN) no modo do íon negativo obtido para a fenitoína na concentração de $(0,5 \text{ mg L}^{-1})$.	132
Figura 4.19 - Espectro de massas LC/MS-ESI (SCAN) no modo do íon positivo obtido para a carbamazepina na concentração de $(0,5 \text{ mg L}^{-1})$.	132
Figura 4.20 - Espectro de massas LC/MS-ESI (SCAN) no modo do íon negativo obtido para a hidantoína na concentração de $(0,5 \text{ mg L}^{-1})$.	133
Figura 4.21 - Diagrama de Pareto para os efeitos estimados para o planejamento fatorial 2^3 + ponto central + estrela para os compostos fenitoína (a), fenobarbital (b) e hidantoína (c) no modo do íon negativo gerado através do software STATISTICA 6.0.	137
Figura 4.22 - Superfícies de resposta para os ACVs (fenobarbital, fenitoína e hidantoína) utilizando a interface ESI no modo do íon negativo na concentração de $0,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$: a) efeitos do capilar e da temperatura para o cone de 21, b) efeitos do cone e do capilar para a temperatura de $155 \text{ } ^\circ\text{C}$ c) efeitos do cone e da temperatura para o capilar de $4,50 \text{ kV}$.	138
Figura 4.23 - Gráfico do perfil de resposta gerado pelo software STATISTICA envolvendo os anticonvulsivantes fenobarbital, fenitoína e hidantoína para as condições otimizadas.	140
Figura 4.24 - Cromatograma do íon total obtido com a interface ESI, no modo de ionização positivo para os ACVs na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. (1) fenobarbital, (2) fenitoína e (3) hidantoína.	141
Figura 4.25 - Diagrama de pareto para os efeitos estimados para o planejamento fatorial 2^3 + ponto central + estrela para os compostos primidona (a), carbamazepina (b) e epóxido-carbamazepina (c) para o modo do íon positivo gerado através do software STATISTICA 6.0.	142
Figura 4.26 - Superfícies de resposta para os ACVs, utilizando a interface ESI no modo do íon positivo na concentração de $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ (primidona) e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (10,11-epóxido-carbamazepina e carbamazepina): a) efeitos do capilar e da temperatura para o cone de 14 V , b) efeitos do cone e do capilar para a temperatura de $158 \text{ } ^\circ\text{C}$ e c) efeitos do cone e da temperatura para o capilar de $4,50 \text{ kV}$.	145
Figura 4.27 - Gráfico do perfil de resposta gerado pelo software STATISTICA envolvendo os ACVs primidona, epóxido-carbamazepina e carbamazepina para as condições otimizadas.	146

Figura 4.28 - Cromatograma do íon total obtido com a interface ESI, no modo de ionização positivo para os ACVs na concentração de 3,0 mg L⁻¹ para: (1) primidona e 0,5 mg L⁻¹ para: (2) epóxido-carbamazepina, (3) carbamazepina. 147

Capítulo 5

Figura 5.1 - Cromatograma do íon total obtido com o acoplamento SPME-LC/MS, no modo de ionização positivo para os ADTs tricíclicos na concentração de 50 ng mL⁻¹. (1) desipramina, (2) nortriptilina, (3) imipramina, (4) amitriptilina e (5) clomipramina (PI). 163

Figura 5.2 - Cromatogramas obtidos com a SPME (PDMS/DVB 60 µm) para amostras de plasma branco normais, plasma hemolizado e amostra de plasma fortificada com ACVs na concentração de 5 mg L⁻¹. 164

Figura 5.3 - Cromatograma típico obtido com o acoplamento SPME-LC para os ACVs na concentração de 18,75 e 50 mg L⁻¹. (1) fenobarbital, (2) epóxido-carbamazepina, (3) fenitoína, (4) carbamazepina e (5) hidantoína (PI). 169

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 2.1 - Estrutura molecular e informações sobre os ADTs estudados.	9
Tabela 2.2 - Estrutura molecular e informações sobre os ACVs estudados	14

Capítulo 3

Tabela 3.1 - Fibras disponíveis comercialmente para SPME.	45
Tabela 3.2 - Matriz de planejamento para um planejamento 2^3 , com ponto central e configuração estrela.	54
Tabela 3.3 - Condições cromatográficas utilizadas na análise dos ADTs.	57
Tabela 3.4 - Níveis e variáveis avaliadas no planejamento fatorial 2^3 .	58
Tabela 3.5 - Níveis e variáveis avaliadas no planejamento fatorial 2^{4-1} .	59
Tabela 3.6 - Condições cromatográficas para a análise dos ACVs.	61
Tabela 3.7 - Níveis e variáveis avaliadas no planejamento fatorial.	62
Tabela 3.8 - Áreas dos picos cromatográficos obtidas com e sem aquecimento.	72
Tabela 3.9 - Matriz de planejamento fatorial 2^3 + ponto central com as respostas para os ADTs obtidos por SPME-LC "on-line" com a fibra PDMS/DVB (60 μm).	77
Tabela 3.10 - Matriz de planejamento fatorial 2^{4-1} com as respostas para os ADTs obtidos por SPME-LC "off-line" com a fibra C_{18} (10 μm).	86
Tabela 3.11 - Matriz de planejamento fatorial 2^{4-1} + ponto central com as respostas para os ACVs obtidos por SPME-LC "on-line" com a fibra PDMS/DVB (60 μm).	92

Capítulo 4

Tabela 4.1 - Massa molecular e íon protonado dos ADTs.	112
Tabela 4.2 - Massa molecular e íon protonado dos ACVs.	113
Tabela 4.3 - Níveis e variáveis que influenciam na variável resposta (área do pico) avaliada no planejamento fatorial dos ADTs para ESI.	114
Tabela 4.4 - Níveis e variáveis que influenciam na variável resposta (área do pico) avaliada no planejamento fatorial dos ADTs para APCI.	114
Tabela 4.5 - Níveis e variáveis que influenciam na variável resposta (área do pico) avaliada no planejamento fatorial dos ACVs para ESI.	114
Tabela 4.6 - Níveis e variáveis que influenciam na variável resposta (área do pico) avaliada no planejamento fatorial dos ACVs para APCI.	115

Tabela 4.7 - Matriz do planejamento fatorial 2^3 + ponto central e configuração estrela com a resposta dos ADTs obtidos em LC/MS-ESI.	121
Tabela 4.8 - Matriz do planejamento fatorial 2^3 + ponto central e configuração estrela com a resposta dos ADTs obtidos em LC/MS-APCI.	122
Tabela 4.9 - Matriz de planejamento fatorial 2^3 + ponto central e configuração estrela com a resposta para os ACVs obtidos em LC/MS-ESI no modo do íon positivo (primidona, epóxido-carbamazepina e carbamazepina) e no modo do íon negativo (fenobarbital, fenitoína e hidantoína).	134
Tabela 4.10 - Matriz de planejamento fatorial 2^3 + ponto central e configuração estrela com a resposta para os ACVs obtidos em LC/MS-APCI no modo do íon positivo (primidona, epóxido-carbamazepina e carbamazepina) e no modo do íon negativo (fenobarbital, fenitoína e hidantoína).	135

Capítulo 5

Tabela 5.1 - Preparação do gráfico analítico para os ADTs.	156
Tabela 5.2 - Preparação do gráfico analítico para os fármacos epóxido-carbamazepina e carbamazepina.	157
Tabela 5.3 - Preparação do gráfico analítico para os fármacos fenitoína e fenobarbital	158
Tabela 5.3 - Valores obtidos para as equações da reta e coeficientes de correlação para os gráficos analíticos dos fármacos ADTs.	160
Tabela 5.4 - Valores obtidos para as equações da reta e coeficientes de correlação para os gráficos analíticos obtidos com a SPME-LC/MS para os ADTs.	160
Tabela 5.5 - Valores da concentração e % DPR na avaliação da precisão intra-dia para a DESI, NOR, IMI e AMI.	161
Tabela 5.6 - Valores da concentração e % DPR na avaliação da precisão entre-dias para a DESI, NOR, IMI e AMI.	161
Tabela 5.7 - Valores obtidos para a recuperação em SPME.	162
Tabela 5.8 - Valores obtidos para as equações da reta e coeficientes de correlação para os gráficos analíticos obtidos com a SPME-LC para os AC Vs.	165
Tabela 5.9 - Valores da concentração e % DPR na avaliação da precisão intra-dia para os fármacos fenobarbital e fenitoína.	166
Tabela 5.10 - Valores da concentração e % DPR na avaliação da precisão intra-dia para os fármacos epóxido-carbamazepina e carbamazepina.	166
Tabela 5.11 - Valores obtidos para a recuperação em SPME para os fármacos CBZ-E e CBZ.	167
Tabela 5.12 - Valores obtidos para a recuperação em SPME para os fármacos PB e FT.	168

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	<i>Agência nacional de vigilância sanitária</i>
GC	<i>Cromatografia em fase gasosa</i>
HPLC	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>
UV	<i>Ultravioleta</i>
MS	<i>Espectrometria de massas</i>
GC/MS	<i>Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas</i>
LC/MS	<i>Cromatografia líquida acoplada espectrometria de massas</i>
LLE	<i>Extração líquido-líquido</i>
SPE	<i>Extração em fase sólida</i>
SPME	<i>Microextração em fase sólida</i>
SBSE	<i>Extração por sorção em barra de agitação</i>
SPME-LC	<i>Microextração em fase sólida acoplada cromatografia líquida</i>
SPME-LC/MS	<i>Microextração em fase sólida acoplada cromatografia líquida e espectrometria de massas</i>
DSM	<i>Manual diagnóstico e estatístico dos transtornos mentais</i>
APA	<i>Associação psiquiátrica americana</i>
OMS	<i>Organização mundial de saúde</i>
ADTs	<i>Antidepressivos tricíclicos</i>
IMI	<i>Imipramina</i>
DESI	<i>Desipramina</i>
NOR	<i>Nortriptilina</i>
AMI	<i>Amitriptilina</i>
CLOMI	<i>Clomipramina</i>
ACVs	<i>Anticonvulsivantes</i>
CBZ	<i>Carbamazepina</i>
CBZ-E	<i>epóxido-carbamazepina</i>
PRM	<i>Primidona</i>
PB	<i>Fenobarbital</i>
FT	<i>Fenitoína</i>
MPPH	<i>Hidantoína</i>
PI	<i>Padrão interno</i>
MeOH	<i>Metanol</i>
ACN	<i>Acetonitrila</i>
PDMS	<i>polidimetilsiloxano</i>
PA	<i>Poliacrilato</i>
PDMS/DVB	<i>Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno</i>
CAR/PDMS	<i>Carboxen/polidimetilsiloxano</i>
CW/DVB	<i>Carbowax/divinilbenzeno</i>
DVB/CAR/PDMS	<i>Divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano</i>
CW/TRP	<i>Carbowax/templated resin</i>

ODS	<i>Fase estacionária do tipo octadecilsilano</i>
API	<i>Ionização à pressão atmosférica</i>
APCI	<i>Ionização química à pressão atmosférica</i>
ESI	<i>Ionização via "electrospray"</i>
d.d.p.	<i>Diferença de potencial</i>
m/z	<i>Razão massa/carga</i>
ToF	<i>Analizador do tipo tempo de voo</i>
SCAN	<i>Modo de varredura de uma faixa de massas</i>
SIM	<i>Modo de monitoramento de um único íon</i>
CID	<i>Dissociação induzida por colisão</i>
V	<i>Volts</i>
kV	<i>Quilo volts</i>
RF	<i>Potencial de rádio frequência</i>
DC	<i>Corrente contínua</i>
V_{DC}	<i>Voltagem Corrente contínua</i>
V_{RF}	<i>Voltagem de rádio frequência</i>
DPR	<i>Desvio padrão relativo</i>
LD	<i>Limite de detecção</i>
LQ	<i>Limite e quantificação</i>

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

CAPÍTULO 1

<i>1.1 - INTRODUÇÃO</i>	<i>1</i>
<i>1.2- OBJETIVOS</i>	<i>5</i>
<i>1.3 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</i>	<i>6</i>

CAPÍTULO 2

<i>2.1 - ANTIDEPRESSIVOS</i>	<i>7</i>
<i>2.1.1 - ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS (ADTs).....</i>	<i>8</i>
<i> IMIPRAMINA (IMI)</i>	<i>10</i>
<i> DESIPRAMINA (DESI)</i>	<i>10</i>
<i> AMITRIPTILINA (AMI).....</i>	<i>11</i>
<i> NORTRIPTILINA (NOR).....</i>	<i>12</i>
<i>2.2 - ANTICONVULSIVANTES (ACVs)</i>	<i>12</i>
<i> CARBAMAZEPINA.....</i>	<i>15</i>
<i> PRIMIDONA</i>	<i>15</i>
<i> FENITOÍNA</i>	<i>16</i>
<i>2.3 - PLASMA</i>	<i>17</i>
<i>2.4 - PADRÃO INTERNO.....</i>	<i>17</i>
<i>2.5- ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....</i>	<i>18</i>
<i>2.6. PARTE EXPERIMENTAL</i>	<i>19</i>
<i> 2.6.1 - REAGENTES E PADRÕES</i>	<i>19</i>
<i> 2.6.2 - EQUIPAMENTO</i>	<i>20</i>

2.6.3- ESCOLHA DA COLUNA	20
2.6.4- ESCOLHA DA FASE MÓVEL	21
2.6.5 - ESCOLHA DO pH DA FASE MÓVEL	21
2.7. - RESULTADOS e DISCUSSÃO	22
2.7.1 - ANTICONVULSIVANTES.....	22
2.7.1.1 - ESCOLHA DA COLUNA.....	22
2.7.1.2 - ESCOLHA DA FASE MÓVEL.....	24
2.7.1.3 - ESCOLHA DO pH DA FASE MÓVEL	26
2.7.2 ANTIDEPRESSIVOS	28
2.7.2.1 - ESCOLHA DA COLUNA	28
2.7.2.2 - ESCOLHA DA FASE MÓVEL	30
2.7.2.3 - ESCOLHA DO PH DA FASE MÓVEL.....	32
2.8 - CONCLUSÕES	34
2.9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

CAPÍTULO 3

3.1 - INTRODUÇÃO	40
3.1.1 - PRINCÍPIOS BÁSICOS DA SPME	40
3.1.1.2 - MODOS DE EXTRAÇÃO	42
3.1.1.3 - RECOBRIMENTOS	43
3.1.1.4 - EFEITO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO.....	45
3.1.1.5 - EFEITO DA TEMPERATURA DE EXTRAÇÃO.....	46
3.1.1.6 - EFEITO DA FORÇA IÔNICA.....	47
3.1.1.7 - EFEITO DO pH.....	48
3.1.1.8 - AGITAÇÃO DA AMOSTRA.....	49
3.1.1.9 - DESSORÇÃO DOS ANALITOS	49
3.2 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	50
3.2.1 - PLANEJAMENTO FATORIAL.....	51
3.3 - PARTE EXPERIMENTAL.....	55
3.3.1 - ANTIDEPRESSIVOS	55

3.3.1.1 - MATERIAIS PARA SPME.....	55
3.3.1.2 - REAGENTES E PADRÕES.....	56
3.3.1.3 - EQUIPAMENTO.....	56
3.3.1.4 - AMOSTRAS.....	57
3.3.1.5 - PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA SPME.....	57
3.3.1.6 - PLANEJAMENTO FATORIAL PARA OS ADTs.....	58
3.3.2 - ANTICONVULSIVANTES.....	59
3.3.2.1 - MATERIAIS PARA SPME.....	59
3.3.2.2 - REAGENTES E PADRÕES.....	60
3.3.2.3 - EQUIPAMENTO.....	60
3.3.2.4 - AMOSTRAS.....	61
3.3.2.5 - PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA SPME.....	61
3.3.2.6 - PLANEJAMENTO FATORIAL PARA OS ACVS.....	62
3.3.2.7 - MODELOS EMPÍRICOS.....	63
3.3.3 - PROJETO DE UMA INTERFACE SPME-LC.....	63
3.3.4 - PROJETO DA INTERFACE COM AQUECIMENTO SPME-LC.....	65
3.3.5 - ETAPA DE DESSORÇÃO TÉRMICA E INJEÇÃO.....	68
3.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
3.4.1- INTERFACE SPME-LC "LABMADE".....	69
3.4.1.1 - INTERFACE SPME-LC - DESSORÇÃO TÉRMICA E INJEÇÃO.....	71
3.4.2 - ANTIDEPRESSIVOS.....	74
3.4.2.1- SELEÇÃO DE FIBRAS PARA OS ADTS.....	74
3.4.2.2 - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA SPME.....	76
3.4.2.3 - FIBRAS "LABMADE".....	84
3.4.2.1- FIBRAS DE SÍLICA MODIFICADA.....	84
3.4.2.4 - CONCLUSÕES.....	89
3.4.3 - ANTICONVULSIVANTES.....	90
3.4.3.1 - SELEÇÃO DE FIBRAS PARA OS ACVS.....	90
3.4.3.2 - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA SPME.....	91
3.4.3.3 - CONCLUSÕES.....	96

3.5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
--	-----------

CAPÍTULO 4

4.1 - INTRODUÇÃO	100
4.1.1 - IONIZAÇÃO QUÍMICA À PRESSÃO ATMOSFÉRICA (APCI)	101
4.1.2 - IONIZAÇÃO VIA ELECTROSPRAY (ESI).....	103
4.1.3 - ANALISADOR DE MASSAS	105
4.1.3.1- ANALISADOR DE MASSAS DO TIPO QUADRUPOLO.....	105
4.1.3.2 - ANALISADOR DE MASSAS DO TIPO CAPTURA DE ÍONS ("ION TRAP")	107
4.1.3.3 - ANALISADOR DE MASSAS DO TIPO TEMPO DE VÔO ("TIME OF FLIGHT")	108
4.2 - EXPERIMENTAL	110
4.2.1- REAGENTES E PADRÕES	110
4.2.2- EQUIPAMENTO	110
4.2.3 - PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA LC/MS.....	111
4.2.4 - PLANEJAMENTO FATORIAL PARA OS ADTS E ACVS	113
4.2.5 - MODELOS EMPÍRICOS	115
4.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	116
4.3.1 - RESULTADOS PARA OS ADTs	116
4.3.2 - CONCLUSÕES.....	129
4.3.3 - RESULTADOS PARA OS ACVs	130
4.3.4 - CONCLUSÕES.....	148
4.4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149

CAPÍTULO 5

5.1 - INTRODUÇÃO	151
5.1.1 - VALIDAÇÃO DO MÉTODO	151
5.1.2 - GRÁFICO ANALÍTICO/ LINEARIDADE.....	151
5.1.3 - ESPECIFICIDADE/SELETIVIDADE	152
5.1.4 - PRECISÃO.....	152

5.1.5 - LIMITE DE DETECÇÃO	153
5.1.6 - LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	153
5.1.7 - RECUPERAÇÃO	154
5.2 - PARTE EXPERIMENTAL	155
5.2.1- ACOPLAMENTOS SPME-LC/MS E SPME-LC	155
5.2.2 - ESPECIFICIDADE/SELETIVIDADE	155
5.2.3 - PREPARAÇÃO DO GRÁFICO ANALÍTICO PARA OS ADTs	155
5.2.4 - PREPARAÇÃO DO GRÁFICO ANALÍTICO PARA OS ACVs	157
5.2.5 - PRECISÃO	158
5.2.6 - LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) E DE DETECÇÃO (LD)	158
5.2.7 RECUPERAÇÃO	159
5.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	159
5.3.1 - VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA OS ADTs	159
5.3.2 - LINEARIDADE	159
5.3.3 - PRECISÃO	161
5.3.4 - RECUPERAÇÃO	162
5.3.5 - LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) E DE DETECÇÃO (LD)	162
5.3.6 - CONCLUSÕES	163
5.4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	164
5.4.1 - VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA OS ACVs	164
5.4.2 - ESPECIFICIDADE	164
5.4.3 - LINEARIDADE	165
5.4.4 - PRECISÃO	166
5.4.5 - RECUPERAÇÃO	167
5.4.6 - LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) E DETECÇÃO (LD)	168
5.4.7 - CONCLUSÕES	169
5.5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	170
CAPÍTULO 6	
6 - CONCLUSÕES GERAIS	172

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

*Ele é o meu Deus, o meu refúgio,
a minha fortaleza, e nele confiarei.
(salmo 91:2)*

1.1 - INTRODUÇÃO

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Órgão do Ministério da Saúde, definiu fármacos ou medicamentos como sendo *“produto farmacêutico, tecnicamente obtido ou elaborado com a finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnósticos”*¹. Os fármacos são usados para um ou mais dos seguintes fins: (a) fornecimento de elementos carentes ao organismo; exemplo: vitaminas, sais minerais, hidrolisados de proteínas, hormônios; (b) prevenção de doenças ou infecção; exemplos: soros e vacinas; (c) combate a uma infecção, exemplos: quimioterápicos, incluindo antibióticos; (d) bloqueio temporário de uma função normal; exemplos: anestésicos gerais e locais, anticoncepcionais orais; (e) correção de uma função orgânica desregulada: (I) disfunção; exemplo: cardiotônicos no tratamento de insuficiência cardíaca congestiva; (II) hipofunção; exemplo: hidrocortisona no tratamento de insuficiência supra-renal; (III) hiperfunção; exemplo: metildopa em hipertensão arterial; (f) destoxificação do organismo; exemplo: antídotos; (g) agentes auxiliares de diagnóstico; exemplo: radiopacos. Geralmente são classificados segundo: (a) estrutura química; (b) ação farmacológica; (c) emprego terapêutico; (d) mecanismo de ação ao nível molecular². Dentre as principais classes de fármacos podemos citar: os antidepressivos, anticonvulsivantes, anti-hipertensivos, anti-inflamatórios, antibióticos, antipsicóticos, anticoncepcionais, dentre vários outros.

A cada dia torna-se mais importante o monitoramento da qualidade e eficácia dos fármacos existentes no mercado, principalmente agora com o surgimento de um grande número de medicamentos genéricos, definidos pela ANVISA como *“aquele que contém o mesmo fármaco (princípio ativo) na mesma dose e forma farmacêutica. É administrado pela mesma via e com a mesma*

indicação terapêutica, apresentando a mesma segurança do medicamento de referência, podendo este ser intercambiável”¹

Uma das grandes preocupações é com relação à interação do fármaco com o sistema biológico que pode apresentar respostas ou efeito de diversas graduações, simplificadas usualmente em dois grandes tipos: benéficos ou maléficos³. Os riscos que substâncias indesejáveis presentes em fármacos impõem a saúde humana, no caso em que a interação produz um efeito maléfico (tóxico) é muito grande. Por isso o desenvolvimento de métodos analíticos que separem e quantifiquem fármacos em fluidos biológicos tem um importante papel.

Recentemente muitos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de melhorar a detecção de fármacos em fluidos biológicos. As técnicas mais empregadas e mais importantes são as cromatográficas, principalmente utilizando GC, GC/MS, HPLC, LC/MS ou técnicas de imunoensaios. As técnicas cromatográficas têm sido referência para análise de fármacos em fluidos biológicos. O tratamento prévio de amostras biológicas, o qual abrange as etapas de extração, pré-concentração e “clean-up”, tem sido requerido nas análises de fármacos, para aumentar a sensibilidade e seletividade analítica. Várias técnicas incluindo extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE), os que permitem injeção direta (“column switching”) e, recentemente, as microtécnicas: microextração em fase sólida (SPME) e a extração por sorção em barra de agitação (SBSE), têm sido utilizadas como técnicas de preparo de amostra para fluidos biológicos.

A técnica de extração líquido-líquido apresenta desvantagens, tais como, consumo de solventes orgânicos de alta pureza, exposição do analista a compostos tóxicos, várias etapas para sua execução e formação de emulsão entre as fases, o que resulta na perda do analito^{4,5,6}.

A extração em fase sólida (SPE) apresenta uma grande variedade de fases extratoras, resultando em diferentes tipos de interações com os analitos favorecendo, desta forma, a seletividade analítica; possibilita a automação das análises e o acoplamento em linha com técnicas cromatográficas. Entretanto, tem apresentado algumas limitações como o bloqueio dos poros da fase extratora pelos componentes da matriz, utilização de solventes orgânicos para a eluição, variações analíticas entre cartuchos extratores e várias etapas operacionais para sua execução ^{4,5,6}.

O acoplamento LC-MS pode ser considerado como sendo uma das mais importantes técnicas da última década do século XX. A LC-MS tornou-se a técnica escolhida para suporte analítico em muitos estágios do desenvolvimento de medicamentos dentro da indústria farmacêutica. Os três pontos principais, nesta área, são a sensibilidade, a seletividade e a rapidez.

Neste trabalho, foi desenvolvida uma interface versátil e de baixo custo, que permite o acoplamento das técnicas SPME-LC/MS para análise dos fármacos antidepressivos tricíclicos e anticonvulsivantes.

O presente estudo foi dividido em 6 capítulos, de forma a apresentar seu desenvolvimento de forma mais didático.

O **Capítulo 1** traz uma breve discussão sobre as motivações para o desenvolvimento do trabalho, com uma síntese do que será apresentado em cada um dos capítulos.

O **Capítulo 2** traz uma explanação das classes dos fármacos escolhidos para o desenvolvimento deste trabalho e a otimização cromatográfica de sua separação.

O **Capítulo 3** é dedicado à técnica de preparo de amostras utilizada na análise dos antidepressivos e anticonvulsivantes. A otimização dos parâmetros que influenciam na eficiência da extração na microextração em fase sólida (SPME) foi realizada utilizando uma abordagem quimiométrica através de planejamento fatorial.

O **Capítulo 4** aborda a otimização dos parâmetros instrumentais em espectrometria de massas, tais como a voltagem do cone, voltagem do capilar, temperatura da fonte e temperatura do APCI, os quais influenciam muito na resposta, utilizando planejamento fatorial para ambas as classes de fármacos.

O **Capítulo 5** refere-se a validação da metodologia desenvolvida para a análise dos fármacos antidepressivos utilizando o acoplamento SPME-LC/MS e para os anticonvulsivantes usando a SPME-LC.

O **Capítulo 6** traz as conclusões finais do trabalho desenvolvido.

1.2- OBJETIVOS

GERAIS

Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de fármacos antidepressivos e anticonvulsivantes em fluidos biológicos (plasma).

ESPECÍFICOS

- 1- Estabelecer as melhores condições cromatográficas de análise para fármacos antidepressivos e anticonvulsivantes, determinados por cromatografia líquida (LC);
- 2- Desenvolver e otimizar metodologia analítica utilizando a técnica de preparo de amostra SPME, para determinação de fármacos em plasma;
- 3- Desenvolver interfaces para o acoplamento das técnicas SPME-LC e SPME-LC/MS;
- 4- Estabelecer as melhores condições de análise para fármacos antidepressivos e anticonvulsivantes, determinadas por LC-MS;
- 5- Validação da metodologia analítica desenvolvida para ambas as classes;

1.3 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANVISA. Medicamentos – Conceitos Técnicos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/medicamentos/conceito.htm>> Acesso em: Nov.2005.
2. KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro, Guanabara Dois, 1982. 783p.
3. SILVA, P. **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A., 1998. 1314p.
4. QUEIROZ, M.E.C.; LANÇAS, F.M. Análise de Fármacos em Material Biológico: Acoplamento Microextração em Fase Sólida “No Tubo” e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Quim. Nova**, v. 28, n.5, p. 880-886, 2005
5. MULLETT, W.M.; LEVSEN, K.; LUBDA, D.; PAWLISZYN, J. Bio-compatible in-Tube Solid-phase Microextraction Capillary for the Direct Extraction and High-performance Liquid Chromatographic Determination of Drugs in Human Serum. **J. Chromatogr. A**, v. 963, p. 325-334, 2002.
6. STAERK, U.; KÜLPMANN, W.R. High-temperature Solid-phase Microextraction Procedure for the Detection of Drugs by Gas Chromatography-mass spectrometry. **J Chromatogr. B**, 745, 399-411, 2000.

CAPÍTULO 2

FÁRMACOS ANTIDEPRESSIVOS E

ANTICONVULSIVANTES E A OTIMIZAÇÃO

CROMATOGRÁFICA DE SUA SEPARAÇÃO

*Eu sou seu criador. Você estava
sob meus cuidados mesmo antes
de nascer. (Isaías 44.2)*

2.1 - ANTIDEPRESSIVOS

A 4.^a edição do Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais (DSM-IV) da Associação Psiquiátrica Americana (APA) situa a depressão nas categorias *transtorno bipolar e transtorno depressivo* (depressão maior com episódios únicos ou recorrentes e as distimias). O transtorno bipolar abrange os subtipos I (episódio maníaco único ou episódio mais recente hipomaníaco, maníaco, misto e depressivo) e II (episódio atual ou mais recente hipomaníaco/depressivo); o transtorno ciclotímico e os transtornos de humor secundários a outros fármacos ou uso/ abuso de drogas ^{1,2}.

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que 13-20% da população mundial apresenta sintomas depressivos, sendo 2-3% desse total atribuídos a indivíduos com transtornos afetivos graves, dos quais 15-30% cometem suicídio ou são potenciais suicidas. Mesmo sob tratamento médico, 30% dos pacientes com diagnóstico depressivo não respondem à terapia farmacológica, devido ao tempo de latência associado ao surgimento do efeito terapêutico e, ainda, aos seus efeitos adversos, os quais contribuem para o abandono da terapia ³.

O tratamento farmacológico eficaz da depressão teve início na segunda metade da década de 50, com o desenvolvimento dos antidepressivos, que foram classificados tradicionalmente em dois grupos: os antidepressivos tricíclicos (ADTs) e os antidepressivos inibidores da monoamina oxidase (IMAO). Posteriormente, surgiram moléculas que não se enquadram em nenhum desses grupos: os antidepressivos não-tricíclicos e não-IMAO, também conhecidos como antidepressivos de segunda geração, ou antidepressivos atípicos ou, ainda, novos antidepressivos ¹.

2.1.1 - ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS (ADTs)

Os antidepressivos tricíclicos são um dos grupos de fármacos utilizados no tratamento de transtornos psiquiátricos, tais como transtornos depressivos, principalmente transtorno depressivo maior ⁴⁻⁸. A função destes fármacos é bloquear a recaptação do neurotransmissor noradrenalina (NA), como é o caso das aminas secundárias desipramina e nortriptilina e do neurotransmissor serotonina (5-HT), como as aminas terciárias amitriptilina, imipramina e clomipramina ^{8,9}.

Os ADTs são rapidamente absorvidos após administração oral. Em geral, após um período de 4 horas, a absorção é virtualmente completa ligando-se em altas proporções às proteínas sangüíneas (75-97 %), principalmente à α -glicoproteína ácida. Após administração oral, mesmo que ocorra absorção completa no intestino, apenas uma fração do fármaco administrado estará disponível biologicamente. A baixa disponibilidade é atribuída, num primeiro tempo, ao efeito da primeira passagem, isto é, a metabolização que ocorre durante a primeira passagem do fármaco através do trato gastrointestinal e do fígado, sendo este último o órgão mais importante para a metabolização dos ADTs ¹.

Os ADTs são altamente lipossolúveis, sofrendo biotransformações hepáticas, principalmente em compostos hidrossolúveis que são eliminados por via renal. Apenas pequena percentagem dos ADTs é eliminada na forma original. A maior parte é excretada pelos rins após hidroxilação seguida de conjugação com o ácido glicurônico ¹. A **Tabela 2.1** ilustra algumas características dos ADTs propostos neste trabalho. Para este grupo de fármacos, diferentes intervalos terapêuticos são requeridos, baixas concentrações são associadas com ausência de efeitos ou efeitos aquém dos esperados, enquanto que diversos efeitos adversos e toxicidade podem surgir com altas concentrações plasmáticas. Assim sendo, muitos estudos

indicam que a farmacoterapia com esses compostos deve ser acompanhada por monitorização terapêutica. Além disso, ADTs são freqüentemente encontrados em casos clínicos e forenses associados a overdose¹⁰⁻¹³.

Tabela 2.1: Estrutura molecular e informações sobre os ADTs estudados^{1,6,14-16}.

Analitos	Massa Molecular	Estrutura Molecular	PKa	Concentração terapêutica (ng mL ⁻¹)
Amitriptilina	277,41		9,40	80-200
Nortriptilina	263,38		10,08	50-150
Imipramina	280,41		9,50	125-250
desipramina	266,39		10,20	115-300
clomipramina	3,14,30		9,30	0,10-0,40

IMIPRAMINA (IMI)

A imipramina, 10,11-Dihidro-N,N dimetil-5H-dibenzo-[b,f]-azepina-5-propanamina, comercializada com o nome de Tofranil® e Imipra®, é um antidepressivo tricíclico indicado para todas as formas de depressão, incluindo-se as formas endógenas, as orgânicas e as psicogênicas e a depressão associada com distúrbios de personalidade ou com alcoolismo crônico. Outras indicações: pânico; condições dolorosas crônicas; terror noturno; enurese noturna (apenas em pacientes acima de 5 anos de idade e somente se as causas orgânicas tiverem sido excluídas) ¹⁷.

DESIPRAMINA (DESI)

A desipramina, 10,11-Dihidro-N-metil-5H-dibenzo-[b,f]-azepina-5-propanamina, é a mais potente do grupo no bloqueio da captação da noradrenalina (NA) e menos potente no grupo inibidor da captação de serotonina (5-HT). Ela é o principal metabólito ativo da imipramina. Suas ações e usos são similares a amitriptilina, mas possui menor efeito sedativo que esse último. Desipramina é usada no tratamento de várias formas de depressão, normalmente em conjunto com psicoterapia. É também usado como analgésico adjuvante da dor crônica. Acredita-se que desipramina incremente a concentração sináptica de norepinefrina no SNC. Ela inibe a absorção desse neurotransmissor pela membrana pré-sináptica. Entretanto, desipramina pode provocar outros efeitos como dessensibilização da adenil ciclase e inibição dos receptores beta-adrenérgicos e serotoninérgicos.

As reações adversas atribuídas a desipramina são diarreia, apetite aumentado, insônia, dor nos olhos, alopecia, ansiedade, aumento da pressão intraocular, dentre outros ¹⁸.

AMITRIPTILINA (AMI)

A amitriptilina (3-(10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]-ciclo-hepteno-5-ilideno)-N,N-dimetil-1-propanamina), cujo nome comercial é Amytril® e Tryptanol® é um eficaz ADT que tem sido largamente usado por mais de 40 anos. O fármaco amitriptilina é metabolizado pelo citocromo hepático P450, principalmente, em nortriptilina e hidroxiamitriptilina. É uma medicação que apresenta bastante efeitos colaterais, dos quais podemos citar ¹⁹:

- Secura da boca, o que propicia o aparecimento de cáries: para contornar o problema a pessoa deve tomar pequenos e constantes goles de água e evitar comer açúcar.
- Constipação (prisão de ventre) que deve ser regulado com enriquecimento de fibras na dieta e não com laxantes.
- Tonteados, zumbidos ou dores de cabeça, sedação ou mesmo prostração.
- Ganho de peso rápido e aumento do apetite.
- Produz leves arritmias cardíacas.
- Diminuição da libido.
- Facilita o surgimento de crises convulsivas em pessoas com epilepsia.
- Problemas de visão.
- Sensação de cansaço e/ou fraqueza muscular.

NORTRIPTILINA (NOR)

A Nortriptilina (3-(10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,b]-ciclohepteno-5-ilideno)-N-mentil-1-propanamina), de nome comercial PAMELOR®, é um antidepressivo tricíclico cujo mecanismo de ação é desconhecido. Inibe a ação de certos neurotransmissores, como a histamina, a serotonina e a acetilcolina, e aumenta o efeito pressor da noradrenalina, mas bloqueia o da fenetilamina. É indicado nas síndromes depressivas de diversas etiologias; depressão reativa, neurose reativa, neurose depressiva, coadjuvante da terapêutica hormonal na síndrome do climatério, arritmia ventricular, incontinência urinária ¹⁷.

2.2 - ANTICONVULSIVANTES (ACVs)

A epilepsia é um transtorno neurológico relativamente comum atingindo, aproximadamente, 0,5 a 1 % da população. O que caracteriza um evento de natureza epiléptica é a presença de crises súbitas e espontâneas associadas a descargas excessivas de neurônios cerebrais. O local da descarga e a sua extensão são fatores determinantes, podendo variar desde uma perda de consciência de poucos segundos até crises complexas de duração prolongada. A epilepsia pode ser classificada em idiopática, quando não se conhece a sua causa, e em secundária, quando associada a um diagnóstico, como de infarto cerebral, tumor, trauma ou doença degenerativa. Crises convulsivas associadas a anemia, hipoglicemia, eclampsia e abstinência de álcool e/ou sedativos não devem ser reconhecidas como de natureza epilépticas ¹.

O tratamento básico para diferentes transtornos convulsivos, vem sendo realizado por fármacos conhecidos como anticonvulsivantes. Desde o final da década de 70 os anticonvulsivantes têm sido monitorados no plasma de pacientes, já que uma boa correlação entre as concentrações e as respostas clínicas tem sido encontrada e, muitas vezes, a terapia com múltiplos fármacos se faz necessária²⁰.

Na **Tabela 2.2** estão apresentados as estruturas químicas e outras características dos anticonvulsivantes estudados neste trabalho.

Tabela 2.2: Estrutura molecular e informações sobre os ACVs estudados.

Analitos	Massa Molecular	Estrutura Molecular	pKa	Concentração Terapêutica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Carbamazepina	236,26			4,0-12
Epóxido-Carbamazepina	252,30			4,0-12
Fenobarbital	232,23		7,30	10-30
Fenitoína	252,26		8,30	10-20
Primidona	218,25		9,20	1,0-2

A seguir são descritas algumas características dos anticonvulsivantes propostos neste estudo.

CARBAMAZEPINA ^{1, 21-27}

A carbamazepina (CBZ), 5H-dibenzeno [b,*f*]azepine-5-carboxamida, de nome comercial Tegretol[®], é um composto tricíclico neutro e altamente lipofílico, usado em crises epiléticas e em desordem psiquiátrica. A CBZ é quase completamente metabolizada no corpo humano com apenas pequenos traços excretados sem modificação na urina, formando 33 metabólitos. O mais importante metabólito é a carbamazepina 10, 11 epóxido (CBZ-E) que posteriormente é metabolizada em compostos inativos e são excretados na urina. A CBZ-E é, também, dotado de atividade anticonvulsivante sendo que sua concentração no plasma e no cérebro pode alcançar cerca de 50% da concentração da CBZ.

PRIMIDONA ^{1,28,29}

A primidona (PRM), 5-Etilhidro-5-fenil-4,6(1H,5H)-pirimidinediona, pode ser considerada como um congênere do fenobarbital, no qual o oxigênio carbonílico da metade uréica é substituído por dois átomos de hidrogênio, porém difere deste no que diz respeito ao espectro anticonvulsivante.

A primidona, em animais e no homem, é metabolizada no fígado gerando dois metabólitos ativos, o fenobarbital (PB) e feniletilmalonamida (PEMA). Ela é mais eficaz que o PB no tratamento de crises parciais complexas, em função do seu composto metabólito, o PEMA. Introduzido em 1912, o fenobarbital substituiu os brometos na prática anticonvulsivante, mas este apresenta algumas desvantagens, como a toxicidade cognitiva-comportamental, tolerância, dependência e pequeno índice terapêutico. O PB é bem absorvido por via oral e largamente distribuído. Cerca de 40 a 50% da droga encontra-se ligada à proteína plasmática. É

metabolizado pelas enzimas microsômicas hepáticas, sendo uma parte excretada como droga ativa nos rins. Este anticonvulsivante é indutor enzimático e pode reduzir as concentrações sangüíneas de outros medicamentos co-administrados, como outros anticonvulsivantes. Por outro lado, outras fármacos, como o ácido valpróico, elevam os níveis sangüíneos do fenobarbital, podendo produzir um quadro de toxicidade. Tanto fenobarbital como o PEMA acumula-se durante tratamento prolongado.

Embora mostre eficácia em monoterapia, a PRM geralmente tem sido prescrita em associações com fenitoína (FT) e/ ou CBZ.

FENITOÍNA ²⁹⁻³³

A fenitoína (FT), difenilhidantoína, constituiu-se no primeiro fármaco não-sedativo disponível para o arsenal dos anticonvulsivantes. É um agente valioso no tratamento de crises tônico-clônicas generalizadas e crises parciais complexas. Ela foi sintetizada pela primeira vez em 1908, por Biltz, porém sua ação anticonvulsivante não foi descoberta até 1938.

A farmacocinética da FT é a mais complexa dentre os anticonvulsivantes. Após administração oral, sua absorção é lenta e geralmente completa, ocorrendo principalmente ao nível do duodeno. É um ácido fraco com hidrossolubilidade limitada, mesmo no intestino, e liga-se em cerca de 90% à proteína plasmática.

A FT quando associada à CBZ aumenta o metabolismo, resultando na diminuição das concentrações plasmáticas destes fármacos e concomitantes redução do efeito clínico.

2.3 - PLASMA

Plasma é a parte do sangue total que foi tratado com substâncias anticoagulantes tais como heparina. Após o tratamento, os componentes celulares do sangue são removidos por centrifugação, e o sobrenadante (plasma) pode então ser utilizado.

Os fármacos estão ligados a proteínas do plasma em vários graus, dependendo de suas propriedades físico-químicas individuais. Em geral, fármacos ácidos e neutros ligam-se principalmente a albumina, e fármacos básicos principalmente à α -glicoproteína ácida. Somente fármacos livres estão disponíveis para distribuição extravascular e eliminação, sendo capazes de atravessar a membrana celular e interagir com receptores de fármacos³⁴.

2.4 - PADRÃO INTERNO^{35,36}

Quando o objetivo da análise é a determinação de um ou alguns constituintes da amostra, a adição de um padrão interno pode auxiliar na compensação de vários erros analíticos. O padrão interno é usado como marcador interno para compensar os efeitos e erros originados na preparação de amostras e na instrumentação analítica que podem alterar a área do pico, incluindo as flutuações do volume da amostra injetada.

A seleção do composto empregado como padrão interno é importante, pois dele dependerá a precisão e a exatidão do método. Os principais pré-requisitos são:

- Possuir estrutura química semelhante à do analito a ser estudado;
- Produzir um pico completamente resolvido, sem interferências;
- Deve eluir próximo aos compostos de interesse;

- Deve comportar-se como os compostos de interesse nos processo químico de pré-tratamento, formação de derivados e extração;
- Não deve estar presente na amostra original;
- Deve ser estável e não ser reativo com os componentes do sistema;
- Não deve ser retido pela fase estacionária, suporte, paredes da coluna ou do sistema de detecção;
- Deve, de preferência, ter baixo custo e ser disponível em elevada pureza.

2.5- ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Atualmente, a técnica analítica mais usada na indústria farmacêutica é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Em particular a HPLC de fase-reversa, tem demonstrado ser muito versátil em sua capacidade para análise simultaneamente de compostos de baixo peso molecular e de diferentes polaridades. A separação de compostos básicos e fortemente polares tem sido uma das tarefas mais difícil em HPLC de fase-reversa.

A sílica gel tem sido a matéria-prima mais importante das fases estacionárias da cromatografia líquida. É um material extremamente versátil, podendo ter sua superfície alterada por derivação química e possibilitando, desta forma, a criação de diversos tipos de fases estacionárias com diferentes mecanismos de separação. É um polímero composto por átomos tetraédricos de silício conectados entre si por átomos de oxigênio (ligações siloxano, Si-O-Si), tendo grupos silanóis (SiOH) de diferentes tipos em sua superfície.

O detector UV-Visível é o mais utilizado em HPLC, sendo seu princípio baseado na absorção de luz ultravioleta ou visível, por parte da amostra, através dela passa radiação eletromagnética.

2.6. PARTE EXPERIMENTAL

2.6.1 - REAGENTES E PADRÕES

Os padrões de anticolvulsivantes carbamazepina, 10,11-epóxido-carbamazepina, fenitoína, fenobarbital e hidantoína foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinhein, Germany). Para o preparo da solução estoque, pesou-se 5 mg do padrão de cada composto e dissolveu-se em 5 mL de metanol. As soluções dos padrões utilizadas no processo analítico foram preparadas com metanol a partir das soluções estoque (1 mg mL^{-1} em metanol).

Os padrões de antidepressivos cloridrato de amitriptilina, cloridrato de imipramina, cloridrato de nortriptilina, cloridrato de desipramina e cloridrato de clomipramina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinhein, Germany). As soluções dos padrões utilizadas no processo analítico foram preparadas com metanol a partir das soluções estoque (2 mg mL^{-1} em metanol).

Metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN), grau HPLC, utilizados no preparo das soluções estoque e na fase móvel foram adquiridos da Mallinckrodt (Paris, Kentucky, USA). A trietilamina, grau HPLC, empregada em testes para reduzir a assimetria dos picos foi adquirida da Mallinckrodt (Phillipsburg, New Jersey, USA). Os sais usados no preparo das soluções tampão utilizadas como fase móvel, grau PA, foram: fosfato de potássio dibásico da Mallinckrodt (Xalostoc, México, México), fosfato de potássio monobásico da Reagen (Rio de Janeiro, Brasil), acetato de amônio e acetato de sódio adquiridos da Mallinckrodt (Phillipsburg, New Jersey, USA).

2.6.2 - EQUIPAMENTO

Para analisar os padrões de ACVs foi utilizado um cromatógrafo líquido LC-10A (Shimadzu, Kioto, Japão), equipado com duas bombas (solvente orgânico e solvente aquoso) LC-10AD, forno para a coluna CTO-10A, detector de arranjo de fotodiodo UV-Vis SPD-M10A, controlador de sistema (CBM-10A) e software de aquisição de dados Class-LC10. Para os fármacos ADTs utilizou-se um cromatógrafo líquido LC-10A_{VP} (Shimadzu, Kioto, Japão), equipado com duas bombas (LC-10A_I), forno para a coluna (CTO-10A_{SVP}), detector UV-Vis de comprimento de onda fixo (SPD-10A_{VP}/ 10A_{VVP}), injetor automático (Sil-10A_I), controlador de sistema (SCL-10A_{VP}) e software de aquisição de dados Class-VP. Os padrões foram injetados individualmente na concentração de 1,0 mg L⁻¹ para ambas as classes de fármacos; após conhecer-se o tempo de retenção de cada composto, os padrões foram injetados juntos, para proceder-se à separação analítica dos mesmos.

2.6.3- ESCOLHA DA COLUNA

Para a análise dos ACVs e ADTs foram testadas duas colunas: uma contendo a fase octil sílica C₈ (250 x 4,6 mm, 5µm) e a outra contendo como fase estacionária octadecil sílica C₁₈ (150 x 4,6 mm, 5µm) ambas adquiridas da Supelco (Bellefonte, PA, USA).

2.6.4- ESCOLHA DA FASE MÓVEL

Para a análise cromatográfica (HPLC) dos analitos, tanto dos ACVs como dos TCAs, foram testados três tipos de fases móveis.

No caso dos ACVs as fases móveis foram: água/ACN (70:30 v/v), a mais utilizada na maioria dos experimentos em HPLC, tampão acetato de sódio (100 mmol L^{-1})/ACN (50:50 v/v), e tampão fosfato de potássio (100 mmol L^{-1})/ACN/MeOH (64;19;17 v/v/v).

Para os ADTs foram: tampão fosfato de potássio (100 mmol L^{-1})/ACN (50:50), tampão acetato de sódio (100 mmol L^{-1})/ACN (50:50) e tampão acetato de amônio (100 mmol L^{-1})/ACN (50:50).

2.6.5 - ESCOLHA DO pH DA FASE MÓVEL

Foram preparadas, tanto para os ACVs como para os ADTs, soluções com diferentes valores de pH, dentro da faixa de intervalo de cada tampão. O pH foi medido com o auxílio de um pH-metro adquirido da Digimed (Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) e cada solução foi titulada com o seu respectivo íon.

2.7. - RESULTADOS e DISCUSSÃO

2.7.1 - ANTICONVULSIVANTES

As determinações terapêuticas de anticonvulsivantes e respectivos metabólitos, ativos ou tóxicos, são mais freqüentemente determinadas no plasma ou no soro. A metodologia é estabelecida segundo fins específicos e recursos disponíveis. Os métodos convencionais para a determinação de anticonvulsivantes baseiam-se em técnicas cromatográficas ou imunoquímicas.

A detecção por absorção UV tem sido atualmente o método mais empregado em HPLC para a classe destes fármacos, devido a sua boa sensibilidade, versatilidade e confiabilidade.

2.7.1.1 - ESCOLHA DA COLUNA

Os testes foram feitos com a coluna **C₈**, fase esta que possui uma cadeia de grupos alquílicos, no caso oito átomos de carbono, ligados à sílica e com fase **C₁₈**, que possui dezoito carbonos ligados à sílica. Com ambas as colunas, obteve-se uma boa resolução e uma boa separação dos compostos de interesse (**Figura 2.1**). Optou-se então pelo uso da **C₁₈**. com base nos trabalhos encontrados na literatura, uma vez que é a coluna mais usada para experimentos com esta classe de fármacos.

Figura 2.1 - Cromatogramas para os ACVs em colunas C₈ (a) e C₁₈ (b), utilizando como fase móvel tampão fosfato de potássio(100 mmol L⁻¹)/ACN/MeOH (64:19:17 v/v/v). (1) primidona, (2) lamotrigina, (3) fenobarbital, (4) epóxi-cabamazepina, (5) fenitoína e (6) carbamazepina.

2.7.1.2 - ESCOLHA DA FASE MÓVEL

A escolha da fase móvel é de extrema importância na separação dos analitos devido a interação que ocorre entre ambos. A fase móvel precisa ser selecionada de modo a não interferir na detecção dos analitos de interesse, manter a solubilidade dos mesmos, produzir a separação desejada e, no caso de tampão, manter a capacidade tamponante no decorrer das análises e estabilizar as espécies iônicas de interesse.

Os cromatogramas típicos obtidos com cada fase móvel são apresentados na **Figura 2.2**. Tanto empregando-se como fase móvel água/ACN, quanto fase móvel tampão acetato de sódio/ACN, não foi possível observar todos os picos dos anticonvulsivantes injetados. Na fase móvel água/ACN só foram detectados os picos correspondentes ao fenobarbital (**3**) e epóxi-cabamazepina (**4**); na fase móvel tampão acetato de sódio/ACN os picos do fenobarbital (**3**), epóxi-cabamazepina (**4**) e carbamazepina (**6**). Na fase móvel tampão fosfato de potássio/ACN/MeOH, a qual apresentou melhor resultado, foi possível observar a presença de todos os fármacos injetados, com uma boa separação e resolução, o que demonstra que nesta fase móvel todas as condições citadas acima foram alcançadas.

Figura 2.2 - Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação dos ACVs: **(a)** água/ACN (70:30), **(b)** tampão acetato de sódio (100 mmol L⁻¹)/ACN (50:50 v/v) e **(c)** tampão fosfato de potássio (100 mmol L⁻¹)/ACN/MeOH 64:19:17 v/v/v). (1) primidona, (2) lamotrigina, (3) fenobarbital, (4) epóxi-cabamazepina, (5) fenitoína e (6) carbamazepina.

2.7.1.3 - ESCOLHA DO pH DA FASE MÓVEL

Os anticonvulsivantes estudados apresentam caráter básico (pKa entre 7,44 a 9,2). Como os testes anteriores mostraram que o melhor tampão para estes fármacos foi fosfato de potássio, novos testes foram feitos para verificar em qual pH estes compostos teriam a melhor resposta no detector UV-Vis com arranjo de fotodiodo. Os valores de pH testados foram: 5,5, 6,5 e 7,5, como apresentado na **Figura 2.3**.

Em todos os valores de pH tivemos boa separação e resolução dos picos, mas quando comparamos as áreas dos picos obtidos nos três cromatogramas observou-se que no pH 5,5 a área foi maior para todos os fármacos quando comparado com os demais.

Figura 2.3 - Cromatogramas típico obtido para os ACVs em diferentes valores de pH do tampão fosfato de potássio **(a)** pH 5,5, **(b)** pH 6,5 e **(c)** pH 7,5 /ACN/MeOH (64:19:17).(1) primidona, (2) lamotrigina, (3) fenobarbital, (4) epóxi-cabamazepina, (5) fenitoína e (6) carbamazepina.

2.7.2 ANTIDEPRESSIVOS

Para fins de monitoramento terapêutico, o grau de especificidade necessário para uma quantificação segura desses compostos no plasma, tem levado a escolha das técnicas cromatográficas como uma das mais adequadas. As vantagens de HPLC para análise dos antidepressivos são sua versatilidade e simplicidade de preparação da amostra, bem como uma larga taxa de linearidade em detectores por absorbância ultravioleta. A separação simultânea dos ADTs é difícil, não somente devido a sua polaridade e sua natureza básica mas, também, devido a sua similaridade estrutural.

2.7.2.1 - ESCOLHA DA COLUNA

Com ambas as colunas, houve uma boa interação entre fase móvel – analito – fase estacionária, obtendo-se boa separação e boa resolução para os compostos (**Figura 2.4**) com um tempo de análise total inferior a 14 minutos. Porém com a coluna C₁₈, que é uma coluna menos polar que a C₈, observou-se um aumento na sensibilidade, devido a obtenção de picos mais estreitos. Logo, as demais análises foram realizadas utilizando a coluna C₁₈.

Figura 2.4 – Cromatogramas de uma mistura de antidepressivos das colunas C₈ (a) e C₁₈ (b), utilizando como fase móvel tampão acetato de amônio 100 mmol L⁻¹ (pH 5,50)/ACN. (1) desipramina, (2) imipramina, (3) nortriptilina, (4) imitriptilina e (5) clomipramina.

2.7.2.2 - ESCOLHA DA FASE MÓVEL

A constituição da porção aquosa da fase móvel causa diferenças no comportamento cromatográfico dos ADTs. Apenas os tampões se mostram adequados, tendo em vista a característica iônica das espécies analisadas. A adição de trietilamina resulta em melhorias na simetria e largura dos picos, pois ela encontra-se na forma do íon trietilamônio quando em solução ácida. Através de vários mecanismos físico-químicos ela diminui a interação dos ADTs que são básicos, com os grupos silanóis residuais da coluna cromatográfica, como estudado por Layne³⁷.

Os resultados dos testes feitos com tampão fosfato de potássio, acetato de sódio e acetato de amônio (100 mmol L^{-1}) em pH 5,50 estão apresentados na **Figura 2.5**. Com a fase móvel fosfato de potássio (**Figura 2.5(a)**), observa-se à presença de dois picos, mas nenhum deles corresponde os ADTs estudados. Utilizando a fase móvel acetato de sódio (**Figura 2.5(b)**), foi possível observar os cinco picos dos ADTs que apresentaram sensibilidade e separação adequada. Porém, os resultados obtidos com a fase móvel acetato de amônio (**Figura 2.5(c)**), quando comparados com acetato de sódio apresentou melhores condições de análise para os ADTs. Com esta fase foi obtido menor tempo de análise, maior sensibilidade para os compostos e, como o objetivo futuro visa o acoplamento SPME-LC/MS esta fase é mais adequada para o acoplamento.

Figura 2.5 - Cromatogramas dos testes das fases móveis (100 mmol L^{-1}) e pH 5,50: (a) tampão fosfato de potássio/ACN (50:50), (b) tampão acetato de sódio/ACN (50:50) e (c) tampão acetato de amônio/ACN (50:50) ambos contendo 0,05 % de trietilamina. (1) desipramina, (2) imipramina, (3) nortriptilina, (4) imitriptilina e (5) clomipramina.

2.7.2.3 - ESCOLHA DO pH DA FASE MÓVEL

Os antidepressivos estudados são de caráter básico. A retenção de compostos básicos dentro da sílica modificada não é somente devido à interação hidrofóbicas entre a analito e grupos apolares da superfície da sílica modificada mas, também, devido a processo de troca de cátions com grupos silanóis residual carregado, quando o meio é ácido, para manter o composto em sua forma carregada.

Foi testada fase móvel em pH 3,80, 4,50 e 5,50 (**Figura 2.6**). Na fase móvel com pH 3,80 não foi possível a injeção dos compostos devido a não estabilização da linha de base. Em pH 5,50 (**Figura 2.6 (a)**) em um intervalo de 0 a 13 minutos e em pH 4,50 (**Figura 2.6 (b)**) os compostos saíram em cerca de 0 a 20 minutos. Ambos mostraram uma boa separação e uma boa resolução. Devido ao menor tempo obtido em pH 5,50, os demais experimentos foram realizados neste valor de pH.

Figura 2.6 – Cromatogramas típicos obtidos para os ADTs em diferentes pHs com tampão acetato de amônio (100 mmol L^{-1}): (a) pH 5,50 e (b) pH 4,50. (1) desipramina, (2) imipramina, (3) nortriptilina, (4) imitriptilina e (5) clomipramina.

2.8 - CONCLUSÕES

Empregando-se o método HPLC descrito, os compostos carbamazepina, epóxi-carbamazepina, primidona, lamotrigina, fenobarbital e fenitoína podem ser analisados em 25 minutos. As melhores condições encontradas para esta classe de composto foram: coluna C_{18} (150 x 4,6 mm, 5 μ m), utilizando como fase móvel tampão fosfato de potássio (100 mmol L⁻¹ - pH 5,50)/ACN/MeOH na proporção de (64:19:17 v/v/v) e com um fluxo de 0,7 mL min.⁻¹ Os compostos quando analisados por HPLC com detector UV-Vis de arranjo fotodiodo, apresentaram boa sensibilidade, separação, resolução e com tempo de retenções reprodutíveis.

A análise dos fármacos ADTs foi bem resolvida, com boa sensibilidade, quando utilizado HPLC com detector UV-Vis de comprimento de onda fixo. As melhores condições encontradas para estes compostos foram: coluna C_{18} (150 x 4,6 mm, 5 μ m), utilizando como fase móvel tampão acetato de amônio (100 mmol L⁻¹ - pH 5,50)/ACN contendo 0,05 % de trietilamina na proporção de (50:50 v/v) e com um fluxo de 0,8 mL min.⁻¹.

2.9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SILVA, P. **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A., 1998. 1314p.
2. AYMARD, G.; LIVI, P.; PHAM Y.T.; DIQUET, B. Sensitive and Rapid Method for the Simultaneous Quantification of Five Antidepressants with their Respective Metabolites in Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode-array Detection. **J. Chromatogr. B**, v. 700, p. 183-189, 1997.
3. ROMEIRO, L. A.S.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. Novas Estratégias Terapêuticas para o Tratamento da Depressão: Uma Visão da Química Medicinal. **Quim. Nova**, v. 26 (3), p. 347-358, 2003.
4. CHEN, A.G.; WING, Y.K.; CHIU, H.; LEE, S.; CHEN, C.N.; CHAN, K. Simultaneous Determination of Imipramine, Desipramine and their 2-and 10-hydroxylated Metabolites in Human Plasma and Urine by High-Performance Liquid Chromatography. **J. Chromatogr. B**, v. 693, p. 153-158, 1997.
5. THEURILLAT, R.; THORMANN, W. Monitoring of Tricyclic Antidepressants in Human Serum and Plasma by HPLC: Characterization of a Simple, Laboratory Developed Method Via External Quality Assessment. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 18, p. 751-760, 1998.
6. YOSHIDA, H.; HIDAKA, K.; ISHIDA, J.; YOSHIKUNI, K.; NOHTA, H.; YAMAGUCHI, M. Highly Selective and Sensitive Determination of Tricyclic Antidepressants in Human Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography with Post-column Tris(2,2'-bipyridyl) Ruthenium (III) Chemiluminescence Detection. **Anal. Chim. Acta**, v. 413, p. 137-145, 2000.
7. SANGANAHALLI, B.G.; JOSHI, P.G.; JOSHI, N.B. Differential Effects of Tricyclic Antidepressant Drugs on Membrane Dynamics – a Fluorescence Spectroscopic Study. **Life Sci.**, v. 68, p.81-90, 2000.
8. IVANDINI, T.A.; SARADA, B.V.; TERASHIMA, C.; RAO, T.N.; TRYK, D.A.; ISHIGURO, H.; KUBOTA, Y.; FUJISHIMA, A. Electrochemical Detection of Tricyclic Antidepressant Drugs by HPLC Using Highly Boron-doped Diamond Electrodes. **J. Electroanal. Chem.**, v. 512, p. 117-126, 2002.

9. PERI-OKONNY, U.L.; KENNDLER, E.; STUBBS, R.J.; GUZMAN, N.A. Characterization of Pharmaceutical Drugs by a Modified nonaqueous Capillary Electrophoresis- Mass Spectrometry Method. **Electrophoresis**, v. 24, p. 139-150, 2003.
10. OLESEN, O.V.; PLOUGMANN, P.; LINNET, K. Determination of Nortriptyline in Human Serum by Fully Automated Solid-phase Extraction and On-line High-Performance Liquid Chromatography in the Presence of Antipsychotic Drugs. **J. Chromatogr. B**, v. 746, p.233-239, 2000.
11. KOLLROSER, M.; SCHOBER, C. Simultaneous Determination of Seven Tricyclic Antidepressant Drugs in Human Plasma by Direct-Injection HPLC-APCI-MS-MS with an Ion Trap Detector. **Ther. Drug Monit.**, v. 24, No. 4, p. 537-544, 2002.
12. YOSHIDA, H.; HIDAKA, K.; ISHIDA, J.; YOSHIKUNI, K.; NOHTA, H.; YAMAGUCHI, M. Highly Selective and Sensitive Determination of Tricyclic Antidepressants in Human Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography with Post-column Tris(2,2'-bipyridyl) Ruthenium (III) Chemiluminescence Detection. **Anal. Chim. Acta**, v. 413, p. 137-145, 2000.
13. AYMARD, G.; LIVI, P.; PHAM Y.T.; DIQUET, B. Sensitive and Rapid Method for the Simultaneous Quantification of Five Antidepressants with their Respective Metabolites in Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode-array Detection. **J. Chromatogr. B**, v. 700, p. 183-189, 1997.
14. ZHAO, J.; OLESIK S. V. Reversed-phase Separation of Basic Tricyclic Antidepressants Using Buffered and Fluoroform-enhanced Fluidity Liquid Mobile Phases. **J. Chromatogr. A**, v. 923, p.107-117, 2001.
15. CANTU, M.D.; HILLEBRAND,S.; QUEIROZ, M.E.C.; LANÇAS, F.M.; CARRILHO, E. Validation of Non-aqueous Capillary Electrophoresis for Simultaneous Determination of four Tricyclic Antidepressants in Pharmaceutical Formulations and Plasma Samples. **J. Chromatogr. B**, 799, 127-132, 2004.
16. RUIZ-ANGEL, M.J.; CARDA-BROCH, S.; SIMÓ-ALFONSO, E.F.; GARCÍA-ALVAREZ-COQUE, M.C. Optimised Procedures for the Reversed-phase Liquid Chromatographic Analysis of Formulations Containing Tricyclic Antidepressants. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, V. 23, p. 71-84, 2003.

17. Antidepressivos tricíclicos 2 disponível em:<<http://www.psiqweb.med.br/farmaco/tricic1.html>> Acesso em: Janeiro.2006.
18. Desipramina disponível em: <<http://www.dermativa.com.br/infotecd.htm>> Acesso em: Janeiro.2006.
19. Amitriptilina Disponível em:<<http://www.pt.wikipedia.org/wiki/Amitriptilina>> Acesso em: janeiro.2006.
20. MAKINO, K.; GOTO, M.S.; FUTAGAMI, K.; KATAOKA, Y.; OISHI, R. Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography for Therapeutic Drug Monitoring of Zonisamide. **J. Chromatogr. B**, v. 695, p.417-425, 1997.
21. MANDRIOLI, R.; ALBANI, F.; CASAMENTI, G.; SABBIONI, C.; RAGGI, M.A. Simultaneous High-Performance Liquid Chromatography Determination of Carbamazepine and Five of its Metabolites in Plasma of Epileptic Patients. **J. Chromatogr. B**, v. 762, p. 109-116, 2001.
22. PIENIMAKI, P.; FUCHS, S.; ISOJARVI, J.; VAHAKANGAS, K. Improved Detection and Determination of Carbamazepine and Oxcarbazepine and their Metabolites by High-Performance Liquid Chromatography. **J. Chromatogr. B**, v. 673, p. 97-105, 1995.
23. CHOLLET, D.; CASTELLA, E.; COMBE, P.; ARNERA, V. High-Speed Liquid Chromatographic Method for the Monitoring of Carbamazepine and its Active Metabolite, Carbamazepine-10,11-Epoxy, in Human Plasma. **J. Chromatogr. B**, v. 683, p. 237-243, 1996.
24. MIAO, X-S.; METCALFE, C.D. Determination of Carbamazepine and Its metabolites in Aqueous Samples Using Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. **Anal Chem.**, v. 75, p. 3731-3738, 2003.
25. ZHU, Y.; CHIANG, H.; WULSTER-RADCLIFFE, M.; HILT, R.; WONG, P.; KISSINGER, C.B.; KISSINGER, P.T. Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry for the Determination of Carbamazepine and its Main Metabolite in Rat Plasma Utilizing an Automated Blood Sampling System. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 38, p. 119-125, 2005.

26. QUEIROZ, M.E.C.; CARRILHO, E.; CARVALHO, D.; LANÇAS, F.M. Comparison of High-Resolution Gás Chromatography and High-Performance Liquid Chromatography for Simultaneous Detemination of Lamotrigine and Carbamazepine in Plasma. **Chromatographia**, v. 53, 485-489, 2001.

27. QUEIROZ, M.E.C.; SILVA, S.M.; CARRILHO, E.; LANÇAS, F.M. Solid-phase Microextraction-Liquid Chromatography (SPME-LC) Detemination of Lamotrigine Simultaneously with Carbamazepine and Carbamazepine 10,11-epoxide in Human Plasma. **J. Sep. Sci.** 25, 91-95, 2002.

28. FERRANTI, V.; CHABENAT, C.; MÉNAGER, S.; LAFONT, O. Simultaneous Determination of Primidone and its Three Major Metabolites in rat Urine by High-Performance Liquid Chromatography. **J. Chromatogr. B**, v. 718, p. 199- 204, 1998.

29. QUEIROZ, M.E.C.; SILVA, S.M.; CARVALHO, D.; LANÇAS, F.M. Detemination of Lamotrigine Simultaneously with Carbamazepine and Carbamazepine Epoxide, Phenytoin, Phenobarbital, and Primidone in Human Plasma by SPME-GC-TSD. **J. Chromatogr. Sci.**, v. 40, 219-223, 2002.

30. SOZZA, MARLENE APARECIDA. **Otimização e Validação de Metodologia Analítica para a Determinação de Fármacos Anticolvulsivantes e seus Metabólitos por MECK**. 2001. 109 f.. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

31. CWIK, M.J.; LIANG, M.; DEYO, K.; ANDREWS, C.; FISCHER, J. Simultaneous rapid High-Performance Liquid Chromatographic Detemination of Phenytoin and its Produg, Fosphenytoin in Human Plasma and Ultrafiltrate. **J. Chromatogr. B**, v. 693, p. 407-414, 1997.

32. GUAN, F.; UBOH, C.E.; SOMA, L.R.; BIRKS, E. K.; TELEIS, D.; RUDY, J. A.; WATSON, A. O.; TSANG, D.S. Quantification of Phenytoin and its metabolites in equine Plasma and Urine Using High-Performance Liquid Chromatography. **J. Chromatogr. B**, v. 746, p. 209-218, 2000.

33. BERECHKI, A.; TOLOKÁN, A.; HORVAI, G.; HORVÁTH, V.; LANZA, F.; MAY, A.J.; SELLERGREN, B. Determination of Phenytoin in Plasma by Molecularly Imprinted Solid-phase Extraction. **J. Chromatogr. A**, v. 930, p. 31-38, 2001.

34. LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of Drugs. **J. Chromatogr. A**, v. 902, p. 17-63, 2000.

35. LEITE, F. **Validação em análise química**. Campinas, Editora Átomo LTDA, 1996. 124p.

36. F. M. LANÇAS, **Validação de métodos Cromatográficos de análise**. São Carlos, Rima, 2004. 62p.

37. LAYNE, J. Characterization and comparison of the chromatographic performance of conventional, polar-embedded, and polar-endcapped reversed phase liquid chromatography stationary phases. **J.Chromatogr. A**, v.957, p.149-164, 2002.

CAPÍTULO 3

MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

*Porque pela graça sois salvos,
por meio da fé; e isto não vem de vós;
é dom de Deus. (Ef. 2:8)*

3.1 - INTRODUÇÃO

O pré-tratamento da amostra na maioria das vezes é o passo que mais consome tempo em um processo analítico, por isso, há uma continua necessidade por procedimentos analíticos mais rápidos e robustos, levando a limites de detecção melhores.

O desenvolvimento da microextração em fase sólida (SPME), por Pawliszyn e colaboradores em 1990, apresenta muitas vantagens quando comparada com as técnicas de preparo de amostras convencionais, já que utiliza pouca ou nenhuma quantidade de solventes orgânicos, os quais encarecem a análise e muitas vezes, são tóxicos ao analista e ao meio ambiente. É um processo rápido, permite automação das análises, concentração dos analitos, e a reutilização das fibras extratoras ¹⁻⁷.

3.1.1 - PRINCÍPIOS BÁSICOS DA SPME

Esta técnica baseia-se na sorção dos analitos em uma fibra, geralmente de sílica fundida, com pequeno diâmetro, revestido com um sorbente. A fibra é introduzida diretamente na amostra ou no *headspace*, extraindo e concentrando o analito de interesse. Posteriormente, é transferida para o instrumento analítico, onde ocorrem a dessorção, separação e quantificação dos analitos ^{8,9}.

O rápido desenvolvimento desta técnica resultou na fabricação de um dispositivo comercializado pela Supelco (**Figura 3.1**). Este dispositivo consiste de uma seringa modificada, montada em um holder protetor, que contém um tubo de aço inox utilizado como agulha de perfuração. Dentro deste tubo encontra-se a fibra

de sílica fundida, que é revestida por uma camada polimérica pura ou heterogênea, cujo comprimento é aproximadamente 1 cm^{10-14} .

Figura 3.1 - Dispositivo comercial utilizado na SPME ⁹

O processo de extração envolve a partição entre os analitos na matriz e na fase estacionária, sendo que este particionamento é controlado por propriedades físico-químicas dos analitos, da matriz e da fase estacionária. No equilíbrio, a quantidade extraída é proporcional ao coeficiente de partição e a concentração do analito na amostra ⁹. O coeficiente de partição é determinado pela interação entre o analito/matriz e o analito/recobrimento. A extração é considerada completa quando a concentração do analito atinge o equilíbrio de distribuição entre o recobrimento e a

matriz. A condição de equilíbrio para um sistema de duas fases (aquosa e sólida) pode ser descrita pela seguinte equação ^{8,9}.

$$N = \frac{K.V_s.V_{aq}.C^{\circ}_{aq}}{K.V_s + V_{aq}}$$

onde **N** é a quantidade extraída pela fase estacionária, **V_{aq}** e **V_s** são os volumes da amostra e da fase estacionária, respectivamente; **K** é o coeficiente de partição entre as duas fases, e **C^o_{aq}** é a concentração dos analitos na amostra.

3.1.1.2 - MODOS DE EXTRAÇÃO

Em SPME dois modos de extração podem ser utilizados: a extração direta (DI-SPME) e a que utiliza a técnica de *headspace* (HS-SPME). Na extração direta a fibra é imersa na amostra e os analitos são transferidos da matriz para o recobrimento da fibra com agitação constante. No modo *headspace* os analitos são transferidos, utilizando aquecimento, para a fase gasosa antes de atingirem o recobrimento da fibra. O principal critério para a seleção do modo de extração é a natureza da matriz, volatilidade e afinidade do analito pela matriz. A **Figura 2** apresenta um gráfico ilustrativo dos modos de extração utilizados em SPME ^{10,14,15}.

A eficiência de extração em SPME pode ser influenciada por diversos parâmetros, incluindo: a característica do recobrimento, temperatura, tempo de extração, força iônica da amostra, variação de pH e velocidade de agitação.

Figura 3.2 - Modos de extração com SPME; **(a)** extração direta e **(b)** modo *headspace* ⁹.

3.1.1.3 - RECOBRIMENTOS

Atualmente, os recobrimentos disponíveis comercialmente para SPME são: polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA), polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB), carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS), carbowax/divinilbenzeno (CW/DVB), divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) e carbowax/Templated Resin (CW/TPR).

A fibra de PDMS de 7 μm contém ligação entrecruzada, que é produzida através de uma reação catalítica. Estas fibras possuem alta estabilidade térmica quando comparadas com as fibras não ligadas. A fase de poliacrilato é parcialmente entrecruzada e altamente polar.

As fibras porosas são cobertas com vários polímeros porosos e misturadas com fases poliméricas parcialmente entrecruzadas. Geralmente, estas fibras têm baixa estabilidade mecânica em relação às fases poliméricas homogêneas, porém

possuem alta seletividade. A fibra de PDMS/DVB foi introduzida em 1996 e refere-se a uma mistura de polímeros sólidos porosos de DVB com líquido polimérico PDMS. A fibra contendo CW/DVB é uma mistura de partículas de polímero poroso sólido divinilbenzeno com a fase líquida carbowax. Esta fase é mais polar que a fase PDMS/DVB e é altamente sensível a oxigênio em temperaturas elevadas, devido à possibilidade de reação de oxidação. A fibra PDMS/CAR, que foi introduzida no comercialmente em 1997, é o resultado da mistura de partículas de carboxen poroso 1006 na faixa de 1-5 μm com o polímero líquido PDMS. A fibra CW/TPR é produzida pela mistura da resina porosa SUPELCOGEL TPR-100, a qual é constituída por polidivinilbenzeno/metacrilato com o polímero líquido carbowax. A resina TPR-100 é menos hidrofóbica que uma resina de divinilbenzeno, mas menos hidrofílica que uma resina metacrilato, esta propriedade oferece uma alta seletividade em relação as demais fibras ¹⁶.

O volume da fase estacionária determina a sensibilidade do método enquanto sua espessura determina o tempo de extração. Assim, a eficiência da extração pode ser melhorada aumentando-se o volume da fase estacionária e, conseqüentemente, a quantidade de analito extraída ¹⁷. A seletividade da extração é função da espessura e características físico-químicas da fase estacionária.

A **Tabela 3.1** mostra as fibras para SPME comercialmente disponíveis, e suas principais características.

Tabela 3.1 - Fibras disponíveis comercialmente para SPME.

Filme	Espessura do filme	Uso recomendado	pH	temp. máxima (°C)	Aplicações
PDMS	100 μm^b 30 μm^b 7 μm^a	GC-HPLC GC-HPLC GC-HPLC	2-10 2-11 2-11	280 280 340	Voláteis, compostos de alta massa molecular semivoláteis não-polares
PA	85 μm^a	GC-HPLC	2-11	320	Compostos orgânicos polares como triazinas e fenóis
PDMS/DVB	65 μm^a 60 μm^a	GC HPLC	2-11 2-11	270	Compostos polares, aminas e voláteis
CAR/PDMS	75 μm^a	GC	2-11	320	Compostos de baixa massa molecular e gases
CW-DVB	65 μm^a	GC	2-9	260	Compostos polares e álcoois.
CW/TPR	50 μm^a	HPLC	2-9	260	Compostos polares
DVB/CAR/PDMS	50/30 ^a μm	GC	2-11	270	-

a - fase ligada

b - fase não ligada

3.1.1.4 - EFEITO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO

O tempo de extração é, principalmente, determinado pela agitação e pela constante de distribuição do analito entre o recobrimento da fibra e a amostra. Ele 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 estabelecer o equilíbrio é longo. Neste caso, embora a SPME tenha uma sensibilidade máxima no ponto de equilíbrio, o equilíbrio completo não é necessário devido à relação linear entre a quantidade de analito extraído pela fibra e a concentração inicial na amostra em condições de não-equilíbrio. Entretanto, em

tais casos, a exposição da fibra na amostra deve ser precisa para obter dados reprodutíveis^{2,17,18}.

3.1.1.5 - EFEITO DA TEMPERATURA DE EXTRAÇÃO

Uma mudança na temperatura de extração tem diversos efeitos sobre a SPME. Com um aumento na temperatura, os coeficientes de difusão e as constantes de Henry's são aumentados, e os coeficientes de partição da fase de extração são diminuídos⁸. Por exemplo, se no sistema de extração (amostra/fibra) ocorre uma mudança de temperatura de T_0 a T , a constante de equilíbrio muda de acordo com a equação¹⁹:

$$K = K_0 \exp \frac{-\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right)$$

onde: K_0 é o coeficiente de partição entre a fibra e o analito na temperatura T_0 (Kelvin), ΔH é a variação molar de entalpia quando ocorre a difusão do analito da amostra para a fase estacionária, e R é a constante dos gases. A variação de entalpia ΔH , é considerada constante na faixa de temperatura tipicamente utilizada para experimentos de SPME. Isto pode ser determinado experimentalmente medindo-se o valor de K em duas diferentes temperaturas.

Quando o valor de K é maior do que 1, a energia potencial do analito no recobrimento é menor do que na amostra, e a partição do analito na fibra é um processo exotérmico, isto é, ΔH é maior do que zero.

De acordo com a Equação acima, o aumento da temperatura leva a uma diminuição de K , reduzindo a quantidade de analito extraída. Por outro lado, leva também a um aumento dos coeficientes de difusão, melhorando a transferência de

massa. Estes fatores (termodinâmico e cinético) têm como consequência um tempo de equilíbrio mais rápido ^{2,9,18}.

3.1.1.6 - EFEITO DA FORÇA IÔNICA

A adição de sal pode, muitas vezes, melhorar a recuperação quando métodos clássicos de extração (SPE e LLE) são usados, sendo observado também o mesmo efeito em SPME. Sais como NaCl, Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, Na₂CO₃, NH₄Cl, MgSO₄ ou K₂CO₃ são usados para este propósito. O efeito da força iônica pode aumentar ou diminuir a quantidade extraída, dependendo do composto e da concentração do sal ^{1,9,11}.

Ocasionalmente, vê-se um aumento inicial no rendimento da extração com um aumento na concentração do sal, com um máximo sendo atingido, seguido pela diminuição na quantidade extraída com o aumento desta concentração. Este comportamento pode ser explicado considerando que os processos estão ocorrendo simultaneamente. Inicialmente, a recuperação do analito é aumentada devido ao efeito “salting out” onde moléculas de água formam esferas de hidratação em volta da molécula iônica do sal. Estas esferas de hidratação reduzem a concentração de água disponível para dissolver as moléculas do analito. Em competição com este processo, no entanto, está o fato que moléculas polares podem participar na interação eletrostática com os íons de sal em solução e, desse modo, reduzir sua capacidade para mover-se sobre ou para dentro da fase de extração. Inicialmente, as interações das moléculas de sal com a água é o processo predominante, mas com o aumento da concentração do sal, as moléculas de sal irão interagir com moléculas dos analitos. Então, é razoável que ocorra um aumento inicial nos analitos

extraídos com aumento na concentração de sal, seguido pela diminuição com a interação do sal com os analitos na solução ^{8,18}.

3.1.1.7 - EFEITO DO pH

O pH da amostra é crucial para a SPME de ácidos e bases. Este é explicado teoricamente pelo acoplamento do equilíbrio de extração e equilíbrio acido-base.

$$K = K_0 \frac{[H^+]}{K_a + [H^+]}$$

onde K_0 é coeficiente de partição entre fibra/analito de uma forma não dissociada, K_a constante de dissociação ⁹.

O ajuste do pH pode melhorar o rendimento de extração para compostos que podem ser protonados. Na maioria dos casos o pH é ajustado para obter os analitos em sua forma neutra, de forma a aumentar o rendimento da extração em combinação com a adição de sal ^{9,18}.

Cuidados têm que ser tomado quando a imersão direta em SPME é usada, pois, valores de pH extremos (menor que 2 e maior do que 11) podem danificar o recobrimento da fibra ¹¹.

3.1.1.8 - AGITAÇÃO DA AMOSTRA

A barra de agitação magnética é amplamente utilizada tanto para a HS-SPME (modo *headspace*) quanto para DI-SPME (modo direto), pois a agitação da amostra aumenta a difusão dos analitos na fibra (recobrimento) e reduz o tempo de extração. Em HS-SPME, a agitação também facilita a transferência de massa entre o *headspace* e a amostra aquosa. Se a agitação da amostra fosse perfeita, todos os analitos presentes na matriz teriam acesso ao recobrimento e a extração seria rápida. Contudo, na prática, independente da velocidade de agitação, o fluido em contato com a superfície do recobrimento da fibra é estacionário, dificultando o acesso dos analitos à fibra e, conseqüentemente, afetando o tempo de extração^{9,16,20,21}.

Embora o tempo de equilíbrio progressivamente decresça com o aumento da taxa de agitação, agitações muito rápidas tendem a ser incontroláveis e a velocidade rotacional pode levar a medidas pouco precisas¹⁴.

3.1.1.9 - DESSORÇÃO DOS ANALITOS

Após a extração, os analitos são transferidos para o instrumento analítico onde ocorre a dessorção, separação e quantificação. Durante a dessorção os analitos difundem-se do filme polimérico para o fluido de arraste.

Quando a SPME é acoplado a GC, a dessorção dos analitos da fibra é direta. A agulha de perfuração do septo do dispositivo de SPME é introduzida dentro do injetor do cromatógrafo gasoso, onde a fibra é exposta na câmara aquecida e os analitos são termicamente desorvidos.

Para o acoplamento SPME-LC, a dessorção é realizada em uma interface apropriada que consiste de uma válvula de seis vias de HPLC com uma câmara especial para a dessorção da fibra, sendo esta interface instalada no lugar do “loop”^{22,23}. A dessorção na interface pode ser realizada de dois modos: dessorção estática e dessorção dinâmica. Na dessorção dinâmica a remoção do analito é feita pela passagem continuamente da fase móvel. No modo estático a fibra é mergulhada na fase móvel contendo solvente orgânico, ou somente em um solvente orgânico por um tempo definido antes da injeção dentro da coluna⁸.

3.2 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Atualmente a possibilidade de obtenção de uma grande quantidade de dados numéricos tem crescido em todos os campos da ciência, incluindo a química analítica, devido ao desenvolvimento de novas técnicas e instrumentação que permitem uma resposta mais rápida. Neste contexto, a aplicação de ferramentas estatísticas é de fundamental importância, principalmente para explorar e entender uma gama crescente de dados e informações originadas de um sistema.

A estratégia mais utilizada quando se quer fazer a otimização de um experimento atualmente é avaliar os fatores um a um, ou seja, uma otimização univariada. Neste tipo de situação todos os fatores são fixados, com exceção do fator que vai ser variado, até encontrar o valor ótimo para este parâmetro. Em seguida, mantendo-se este fator no nível ótimo encontrado, variam-se os demais fatores sucessivamente um a um até que todos sejam otimizados. Neste tipo de procedimento, alguns resultados e interpretações incompletas podem ocorrer, devido ao fato de que os efeitos de interação entre as variáveis não são explorados.

Desta forma, a melhor maneira de proceder tal otimização é variar todos os fatores ao mesmo tempo, ou seja, promover uma otimização multivariada, fazendo-se uso de planejamentos experimentais, onde geralmente os números de experimentos executados são menores se comparados com aqueles obtidos em uma otimização univariada.

3.2.1 - PLANEJAMENTO FATORIAL ²⁴⁻²⁷

O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística importante e simples, porém, pouco empregada. Para executar um planejamento fatorial, deve-se começar especificando-se os níveis em que cada fator deve ser estudado, isto é, os valores que serão atribuídos aos fatores para realizar os experimentos. Normalmente, são atribuídos valores para os níveis baixos (-) e valores para o nível alto (+), fazendo-se todas as combinações possíveis como, por exemplo, no caso de otimização da temperatura de um experimento, onde as temperaturas estudadas estarão em um intervalo de 20 a 60 °C. Neste caso, a menor temperatura 20 °C será o nível baixo e a 60 °C o nível alto, com a possibilidade de incluir um experimento no centro, por exemplo em 40 °C, quando as variáveis são contínuas. Este ponto combina os valores de todas as variáveis e é útil para ver o que acontece entre o nível alto e baixo. Além da inclusão de ensaios no ponto central, há a possibilidade de verificar, também, o que ocorre em pontos deferentes dos estabelecidos nos níveis alto e baixo. Essa ampliação pode ser feita de várias maneiras, sendo a mais comum a construção do chamado planejamento (configuração) em estrela. Para fazer um planejamento em estrela, simplesmente acrescentamos ao planejamento inicial um

planejamento idêntico, porém girado de 45 graus em relação à orientação de partida. O resultado é uma distribuição octogonal, como ilustrado na **Figura 3.3**.

Figura 3.3 – Planejamento em estrela para duas variáveis ¹⁴

Assim, os novos pontos estão a uma distância com relação aos primeiros de $\sqrt{2}$ unidades codificadas do ponto central. Todos eles estão portanto, sobre uma circunferência de raio $\sqrt{2}$.

Em geral, se houver n_1 níveis do fator 1, n_2 do fator 2,....., e n_k do fator k, o planejamento será um fatorial $n_1 \times n_2 \times n_k$. Para k fatores, isto é, k variáveis, um planejamento completo de dois níveis exige a realização de $2 \times 2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ ensaios diferentes, sendo por isso chamado de planejamento fatorial. A vantagem do planejamento fatorial completo é que se pode estimar os efeitos principais e todos os efeitos de interação de todas as variáveis nas respostas. A lista dessas

combinações é chamada de matriz de planejamento (**Tabela 3.2**) que inclui também ensaios no ponto central e configuração estrela.

O número de ensaios necessários para se fazer um planejamento fatorial 2^k completo aumenta rapidamente com k , o número de fatores investigados. Assim, quando o planejamento completo exige um número de ensaios muito elevado é possível obter as informações desejadas a partir de um número de ensaios bem menor utilizando somente uma fração do número de ensaios do planejamento completo fazendo uso de planejamentos fracionários.

Tabela 3.2 – Matriz de planejamento para um planejamento 2^3 , com ponto central e configuração estrela.

Ensaio	Fator 1	Fator 2	Fator 3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

3.3 - PARTE EXPERIMENTAL

3.3.1 - ANTIDEPRESSIVOS

3.3.1.1 - MATERIAIS PARA SPME

- “Holder” manual para SPME adquirido da Supelco (Bellefonte, PA,USA);
- Fibras adquiridas da Supelco (Bellefonte, PA,USA): poliacrilato (85 μm), polidimetilsiloxano (100 μm), polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (60 μm) e carboxen/polidimetilsiloxano (75 μm).

• Fibras para SPME, produzidas no Laboratório de Cromatografia do IQSC/USP, conforme as fases apresentadas abaixo:

Partículas esféricas: de sílica quimicamente ligada a C₁₈, 10 e 3,5 μm diâmetro e sílica quimicamente lidada a C₁

- Frasco transparente para SPME (5 mL) com tampa de rosca e septo de teflon/silicone adquirido da Supelco (Bellefonte, PA,USA);
- Barra de agitação magnética;
- Interface SPME-LC, projetada e produzida no Laboratório de Cromatografia (CROMA) do IQSC/USP.

3.3.1.2 - REAGENTES E PADRÕES

Os padrões de antidepressivos cloridrato de amitriptilina, cloridrato de imipramina, cloridrato de nortriptilina, cloridrato de desipramina e cloridrato de clomipramina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Para o preparo da solução estoque, pesou-se 10 mg do padrão de cada composto e dissolveu-se em 5,0 mL de metanol. A partir das soluções estoques foram feitas as diluições necessárias para os experimentos.

Metanol, grau HPLC, utilizado no preparo das soluções estoque e acetonitrila, grau HPLC, utilizado na fase móvel foram adquiridos da Mallinckrodt (Paris, Kentucky, USA). A trietilamina, grau HPLC, empregada em testes para reduzir a assimetria dos picos foi adquirida da Mallinckrodt (Phillipsburg, New Jersey, USA).

Os sais, grau PA, utilizados no preparo das soluções tampão para a SPME e fase móvel foram: carbonato de sódio adquirido da Synth (Diadema, São Paulo, Brasil) e acetato de amônio adquirido da Mallinckrodt (Paris, Kentucky, USA).

3.3.1.3 - EQUIPAMENTO

Para analisar os padrões dos antidepressivos (desipramina, nortriptilina, imipramina e amitriptilina) foi utilizado um cromatógrafo líquido LC-10A_{VP} (Shimadzu, kioto, Japão), equipado com duas bombas (LC-10A_I), forno para a coluna (CTO-10A_{SVP}), detector UV-Vis de comprimento de onda fixo (SPD-10A_{VP}/ 10A_{VVP}), amostrador automático (Sil-10A_I), controlador de sistema (SCL-10A_{VP}) e software de aquisição de dados Class-VP. As condições cromatográficas adotadas estão apresentadas na **Tabela 3.3**.

Tabela 3.3 - Condições cromatográficas utilizadas na análise dos ADTs.

COLUNA	Zorbax Eclipse XDB-C18 (2,1 x 150 mm, 5 µm)
Fase móvel	Tampão acetato de amônio 50 mmol L ⁻¹ (pH 5,50):ACN (58:42 v/v) c/ 0,05% de trietilamina
Modo de eluição	Isocrático
Vazão da fase móvel	0,25 mL min ⁻¹
Temperatura	45 °C
Comprimento de onda	214 nm
Volume injetado	20 ou 60 µL

3.3.1.4 - AMOSTRAS

As amostras de plasma, branco de referência, livres de antidepressivos e sorologicamente negativas para hepatite B e C, HIV, chagas, sífilis foram cedidas pelo Hospital Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Carlos.

3.3.1.5 - PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA SPME

A extração foi feita em um frasco de vidro de 5 mL, de forma cônica, contendo, em seu interior, uma mini barra de agitação magnética de forma triangular. Adiciona-se a amostra de padrões dos antidepressivos em metanol na concentração desejada e evaporou-se sob fluxo de N₂. Em seguida, adicionou-se 1mL de plasma, 4,0 mL da solução tampão carbonato de sódio na concentração de 60 mmol L⁻¹. Esta mistura foi homogeneizada por 20 s antes da extração. A fibra foi então imersa na amostra com agitação de 1200 rpm, temperatura ambiente por 30 minutos na etapa de escolha da fibra. Após a extração os fármacos foram

dessorvidos (off-line), usando um volume de 200 μL , ou (on-line) na interface “lab-made” pela exposição da fibra na fase móvel por 20 minutos, sendo na sequência efetuado a limpeza da fibra pela imersão desta em 5 mL da mistura água/metanol (50:50 v/v).

3.3.1.6 - PLANEJAMENTO FATORIAL PARA OS ADTs

Para avaliar a influência das 3 variáveis (temperatura, tempo de extração e pH) sobre a variável resposta elaborou-se um planejamento fatorial completo 2^3 + ponto central, totalizando 11 experimentos, apresentado na **Tabela 3.4**.

Para as fibras “lab-made” foi avaliada a influência das 4 variáveis (temperatura, tempo de extração, pH e efeito do eletrólito) utilizando um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} , totalizando 8 experimentos, apresentado na **Tabela 3.5**.

Tabela 3.4 - Níveis e variáveis avaliadas no planejamento fatorial 2^3 .

Variáveis	Níveis		
	Baixo	Médio	Alto
Tempo (min)	10	30	45
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	30	45	60
pH	9	10	11

Tabela 3.5 - Níveis e variáveis avaliadas no planejamento fatorial 2^{4-1} .

Variáveis	Níveis	
	Baixo (-)	Alto (+)
Tempo (min)	10,00	30,00
Temperatura (°C)	30,00	50,00
pH	5,50	8,00
NaCl (%)	Não	10

3.3.2 - ANTICONVULSIVANTES

3.3.2.1 - MATERIAIS PARA SPME

- “Holder” manual para SPME adquirido da Supelco (Bellefonte, PA,USA);
- Fibras comerciais adquiridas da Supelco (Bellefonte, PA, USA):
polidimetilsiloxano/divinilbenzeno-PDMS/DVB (60 μm), polidimetilsiloxano-PDMS (100 μm), poliacrilato-PA (85 μm) e carbowax/templated resin-CW/TPR (50 μm).
- Frasco transparente para SPME (5 mL) com tampa de rosca e septo de teflon/silicone adquirido da Supelco (Bellefonte, PA,USA);
- Barra de agitação magnética;
- Interface SPME-LC, projetada e produzida no Laboratório de Cromatografia (CROMA) do IQSC/USP.

3.3.2.2 - REAGENTES E PADRÕES

Os padrões de anticolvulsivantes carbamazepina, 10,11-epóxido-carbamazepina, fenitoína, fenobarbital e hidantoína foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Para o preparo da solução estoque, pesou-se 5 mg do padrão de cada composto e dissolveu-se em 5 mL de metanol. A partir das soluções estoques foram feitas as diluições necessárias para os experimentos.

Metanol e acetonitrila, grau HPLC, utilizados no preparo das soluções estoque e na fase móvel foram adquiridos da Mallinckrodt (Paris, Kentucky, USA). A

Os sais, grau PA, utilizados no preparo das soluções tampão utilizadas para SPME e fase móvel foram: fosfato de potássio dibásico da Mallinckrodt (Xalostoc, México, México), fosfato de potássio monobásico da Reagen (Rio de Janeiro, Brasil) e acetato de amônio adquirido da Mallinckrodt (Paris, Kentucky, USA).

3.3.2.3 - EQUIPAMENTO

Para analisar os ACVs foi utilizado um cromatógrafo líquido LC-10A_{VP} (Shimadzu, Kioto, Japão), equipado com duas bombas (LC-10A_t), forno para a coluna (CTO-10A_{SV}), detector UV-Vis de comprimento de onda fixo (SPD-10A_{VP}/10A_V), injetor automático (Sil-10A_i), controlador de sistema (SCL-10A_{VP}) e software de aquisição de dados Class-VP. As condições cromatográficas adotadas estão apresentadas na **Tabela 3.6**.

Tabela 3.6 - Condições cromatográficas para a análise dos ACVs.

COLUNA	Shimadzu ODS (150 x 4,6 mm, 5 μm)
Fase móvel	Tampão acetato de amônia 50 mmol L ⁻¹ (pH 5,50):ACN:MeOH (55:22:23 v/v)
Modo de eluição	Isocrático
Vazão da fase móvel	0,8 mL min ⁻¹
Temperatura	45 °C
Comprimento de onda	220 nm
Volume injetado	20 ou 60 μ L

3.3.2.4 - AMOSTRAS

As amostras de plasma, branco de referência, livres de anticonvulsivantes e sorologicamente negativa para hepatite B e C, HIV, chagas, sífilis foram cedidas pelo Hospital Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Carlos.

3.3.2.5 - PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA SPME

A extração foi feita em um frasco de vidro de 5 mL, de forma cônica, contendo, em seu interior, uma mini barra de agitação magnética de forma triangular. Adicionou-se a amostra de padrões dos anticonvulsivantes em metanol na concentração desejada e evaporou-se sob fluxo de N₂. Em seguida, adicionou-se 1mL de plasma e acrescentou-se 4,0 mL da solução tampão fosfato de potássio 60 mmol L⁻¹. Esta mistura foi novamente homogeneizada por 20s antes da extração. A

fibra foi então imersa na amostra com agitação de 1200 rpm. Após a extração os fármacos foram dessorvidos (on-line) na interface “home made” pela exposição da fibra na fase móvel por 20 min.

3.3.2.6 - PLANEJAMENTO FATORIAL PARA OS ACVS

Para avaliar a influência das 4 variáveis temperatura, tempo de extração, pH e adição de eletrólito na extração dos fármacos anticonvulsivantes, elaborou-se um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} + ponto central, totalizando 11 experimentos, apresentados na **Tabela 3.7**.

Tabela 3.7 - Níveis e variáveis avaliadas no planejamento fatorial.

Variáveis	Níveis		
	Baixo	Médio	Alto
Tempo (min)	10	30	45
Temperatura (°C)	30	45	60
pH	5	7	10
% de NaCl	0	15	30

3.3.2.7 - MODELOS EMPÍRICOS

Os Modelos matemáticos empíricos com ajuste de equação quadrática foram construídos no software STATISTICA 6,0, e seus resultados avaliados por análise de variância (ANOVA) e suas respectivas superfícies de resposta foram construídas nas condições otimizadas.

3.3.3 - PROJETO DE UMA INTERFACE SPME-LC

Para o acoplamento SPME-LC foi projetada e construída uma interface no Laboratório de Cromatografia da USP de São Carlos.

As **Figuras 3.4 a 3.6** mostram o projeto e fotografias da interface SPME-LC.

O sistema SPME-LC é composto por um módulo contendo:

- 1 válvula 6 vias (Valco);
- Interface SPME-LC;
- Suporte da interface.

Figura 3.4 – Desenho em 3D do corpo da câmara de desorção ¹⁵.

Figura 3.5 – Fotografia da interface SPME-LC.

Figura 3.6 – Módulo da interface SPME-LC interligada ao sistema cromatográfico.

3.3.4 - PROJETO DA INTERFACE COM AQUECIMENTO SPME-LC²⁸

Para o acoplamento SPME-LC foi projetada e construída uma interface no Laboratório de Cromatografia da USP de São Carlos.

O sistema SPME-LC é composto por um módulo contendo:

- 1 válvula 6 vias Valco (Houston, USA);
- Câmara de dessorção SPME-LC;
- Bloco de aquecimento
- Suporte da interface.

A câmara de dessorção possui um volume interno de 60 μ L, com um bloco de aquecimento. A temperatura da câmara e do bloco é mantida constante com utilização de uma resistência de 25 W com 9,4 mm diâmetro e 39 mm de comprimento, sendo medida com um termopar PT 100 adquiridos da Casa Ferreira (São Paulo, Brasil).

A **Figura 3.7** mostra o diagrama esquemático da interface com aquecimento SPME-LC, ilustrada nas **Figuras 3.8 a 3.10**.

Figura 3.7 - Diagrama esquemático da interface com aquecimento SPME-LC.

Figura 3.8 – Fotografia da interface SPME-LC com aquecimento.

Figura 3.9 – Fotografia da interface SPME-LC com aquecimento, interface aberta mostrando a câmara de dessorção.

Figura 3.10 – Módulo da interface SPME-LC com aquecimento interligado ao sistema cromatográfico.

3.3.5 - ETAPA DE DESSORÇÃO TÉRMICA E INJEÇÃO

Na interface SPME-LC a dessorção dos analitos é realizada no modo estático, onde a fibra permanece durante um intervalo de tempo na interface em contato com um volume de 60 μL de fase móvel aquecida. Terminado o tempo de dessorção, retira-se a fibra da interface, muda-se a válvula de injeção da posição carga para a posição de injeção e, então, os analitos são enviados para a coluna cromatográfica ocorrendo a separação. Na **Figura 3.11** é mostrado o modo de dessorção estático e o modo de injeção da interface desenvolvida.

Figura 3.11 - Diagrama esquemático da válvula de 6 vias mostrando: (A) modo de dessorção estático e (B) modo de injeção.

3.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1- INTERFACE SPME-LC "LABMADE"

O acoplamento entre SPME e cromatografia gasosa só pode ser aplicável a análise de compostos voláteis ou passíveis de volatilização com facilidade e compostos termicamente estáveis a temperatura de análise, o que torna necessário o desenvolvimento de interfaces as quais permitam análises de compostos não voláteis e termicamente lábeis. O desenvolvimento de uma interface, a qual permita o acoplamento SPME-LC é necessário para suprir os requisitos da LC com as possibilidades da SPME, visto que não é possível instalar a fibra diretamente no injetor do cromatografo líquido e realizar um procedimento similar ao de GC.

Pawliszyn (1995) desenvolveu uma interface para este acoplamento que é comercializada pela Supelco. Esta interface apresenta problemas quanto a vazamento, alargamento dos picos, baixa recuperação e tem um custo muito elevado. Devido a este fato, foi desenvolvido no Laboratório de Cromatografia um sistema similar, projetado pelo Dr. José Carlos Rodrigues durante projeto de Pós-Doutorado, com algumas modificações, visando melhoramento da interface. A interface foi toda construída em aço 316 L (aço cirúrgico), ou seja, um material totalmente inerte. A câmara de dessorção foi projetada para um volume de 60 μ L, para tentar resolver os problemas de alargamento dos picos. Após o término da interface foi feito um trabalho de polimento, para eliminar possíveis imperfeições que tenha ficado durante o processo de confecção.

A **Figura 3.12** apresenta os cromatogramas sobrepostos dos padrões de antidepressivos obtidos no cromatógrafo líquido LC-10A, injetados através de auto-injetor (vermelho) e através da interface (preto). Ao comparar-se os dois cromatogramas, observa-se que os perfis cromatográficos são iguais em ambos os

casos, ou seja, a interface apresentou um excelente desempenho quando se fez a injeção dos padrões antidepressivos, não apresentando alargamentos dos picos. Nota-se apenas uma pequena diferença com relação à altura dos picos (altura dos picos obtidos pela interface > altura dos picos obtidos pelo auto-injetor), atribuída ao fato de que o detector UV é um detector sensível a concentração e, logo, a diferença observada é devido a diferença de volume injetado.

Figura 3.12 - Cromatogramas sobrepostos dos padrões de ADTs obtidos no cromatógrafo líquido LC-10^A, injetados através de auto-injetor (vermelho) e através da interface (preto). 1) desipramina, 2) nortriptilina, 3) imipramina, 4) amitriptilina e 5) clomopramina (padrão interno).

3.4.1.1 - INTERFACE SPME-LC - DESSORÇÃO TÉRMICA E INJEÇÃO

Os resultados obtidos com o sistema que possibilita a dessorção térmica foram muitos promissores. A interface “*labmade*” que permite o acoplamento do sistema SPME-LC/MS melhorou o dessorção dos analitos quando comparada ao processo *off-line* em duas maneiras distintas. Primeiro, porque a quantidade total dos analitos dessorvidos é injetada, diferente do processo *off-line*, onde somente parte da solução é analisada. Segundo, a interface tem uma câmara de aquecimento que aumenta a transferência de massa do analito da fibra para a fase móvel aquecida logo, a temperatura é um fator muito importante a ser estudado na dessorção dos analitos. A temperatura na dessorção diminuiu, também, o efeito de memória (*carry over*) que gera problemas com repetibilidade de área entre uma extração e outra. Com base, nos resultados acredita-se que a interface com aquecimento, desenvolvida no laboratório de Cromatografia, apresentará grandes colaborações para o acoplamento SPME-LC.

As áreas comparativas (**Tabela 3.8**) e o cromatograma (**Figura 3.13**) obtidos com a SPME-LC para a mistura dos fármacos ADTs, na concentração de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, em plasma utilizando a fibra de PDMS/DVB (60 μm) com temperatura de dessorção de 50 °C e temperatura ambiente estão apresentados a seguir.

Tabela 3.8 - Áreas dos picos cromatográficos obtidas com e sem aquecimento.

Compostos	Sem aquecimento	Com aquecimento
DESI	26832	52429
NOR	33127	72907
IMI	11768	22626
AMI	19119	40168
CLOMI	54443	145074

Figura 3.13 - Cromatograma dos fármacos ADTs obtidos com temperatura de dessorção ambiente e a 50 °C utilizando a interface “*labmade*”: 1) desipramina, 2) nortriptilina, 3) imipramina, 4) amitriptilina e 5) clomipramina (padrão interno).

Também, foram realizados testes com os fármacos ACVs avaliando várias temperaturas de dessorção (**Figura 3.14**). Pode-se observar que houve um aumento significativo em termos de altura e área dos picos a medida que a temperatura de dessorção foi aumentada, com exceção do fármaco fenobarbital que teve uma diminuição na quantidade de dessorção a 60 °C.

Figura 3.14 - Cromatogramas dos fármacos ACVs obtidos com temperatura de dessorção a 40 °C, 50 °C e 60 °C utilizando a interface “*labmade*”: 1) fenobarbital, 2) epóxido-carbamazepina, 3) fenitoína e 4) carbamazepina.

3.4.2 - ANTIDEPRESSIVOS²⁹

3.4.2.1- SELEÇÃO DE FIBRAS PARA OS ADTS

Assim, como na cromatografia não existe uma coluna que separe todos os analitos, na SPME também são necessários diferentes tipos de recobrimentos para a fibra, não havendo uma fase que extraia todos os analitos na mesma extensão. Como a SPME envolve um processo de equilíbrio de partição dos analitos entre a amostra e a fase extratora torna-se importante, efetuar-se uma seleção da fase estacionária mais apropriada.

A escolha da fibra é o primeiro passo em uma metodologia SPME para a obtenção de bons resultados sendo, geralmente, feita levando-se em conta a polaridade dos analitos. As propriedades (físicas e químicas) da fase extratora são cruciais para o processo de partição. Existem dois tipos de recobrimentos de fibras disponíveis comercialmente: as com camada polimérica pura, como é o caso da PDMS e a PA, ambas as fibras com recobrimentos líquidos; e o segundo grupo que inclui PDMS/DVB, CW/DVB, CAR/PDMS, DVB/CAR/PDMS e a CW/TPR que são misturas na qual uma das fases de extração é um sólido poroso.

Para a seleção foram realizados experimentos qualitativos para avaliar o desempenho do recobrimento das fibras de PDMS (100 µm), PA (85µm), PDMS/DVB (60 µm), CAR/PDMS (75µm). A eficiência da extração dos ADTs expressa pela área dos picos cromatográficos com as 4 fibras é apresentada na **Figura 3.15**.

Figura 3.15 – Áreas dos picos cromatográficos para os ADTs obtidas com diferentes recobrimentos.

A seleção dos recobrimentos é baseada, principalmente no princípio “semelhante dissolve semelhante”. Considerando que os ADTs são compostos semi-polares, após a comparação das áreas dos picos cromatográficos os recobrimentos PA (fase polar) e PDMS (fase não-polar) não apresentaram uma boa performance para a extração destes fármacos. Por outro lado, os recobrimentos mistos, tais como PDMS/DVB e CAR/PDMS que tiveram a sua polaridade modificada com a inserção de grupos divinilbenzeno e de partículas porosas de carvão ativo, foram os recobrimentos que apresentaram os melhores resultados. Contudo, quando o desempenho de ambos os recobrimentos foram comparados, os resultados foram consideravelmente melhores com a fibra PDMS/DVB, com exceção do composto imipramina que apresentou melhor extração com a fibra CAR/PDMS.

3.4.2.2 - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA SPME

Após a escolha do melhor recobrimento e da temperatura adequada para a dessorção dos ADTs, a etapa seguinte consiste em estudar as variáveis que tem influência sobre o resultado. As variáveis estudadas, os níveis avaliados e a matriz de contraste com os resultados obtidos para cada ADTs com a fibra PDMS/DVB (60 µm) estão apresentados na **Tabela 3.9**.

Os resultados obtidos com o planejamento proposto foram analisados utilizando o programa STASTICA (versão 6,0).

Na **Figura 3.16** é apresentado o diagrama de Pareto com a influência de cada parâmetro avaliado e suas interações sobre a quantidade extraída. A linha tracejada indica a região acima da qual os efeitos são significativos (com limite de confiança de 95%). Neste tipo de gráfico, quanto mais longa é a barra, maior é a influência (positiva ou negativa) na resposta de interesse. Como os resultados obtidos para os fármacos ADTs apresentam o mesmo perfil de interações, apenas o diagrama da DESI será apresentado com intuito de verificar a influência de cada variável na extração. A porcentagem de variação explicada pelo modelo para o planejamento 2^3 + ponto central variou de 84 a 91%, permitindo uma adequada avaliação da influência das variáveis estudadas.

Tabela 3.9 - Matriz de planejamento fatorial 2^3 + ponto central com as respostas para os ADTs obtidos por SPME-LC “on-line” com a fibra PDMS/DVB (60 μ m).

Ensaio	Temp °C	Tempo (min)	pH	DESI	NOR	IMI	AMI	CLOMI
Áreas cromatográficas dos ADTs								
1	-1	-1	-1	46237	71563	24111	39595	50844
2	+1	-1	-1	242460	365159	119031	187882	166874
3	-1	+1	-1	197558	288772	97752	160302	171676
4	+1	+1	-1	322078	482704	165327	274188	321736
5	-1	-1	+1	62092	95368	35396	64509	74287
6	+1	-1	+1	163102	226179	71005	114844	115229
7	-1	+1	+1	471487	767543	234555	477159	571149
8	+1	+1	+1	344308	475805	164617	252861	277351
9	0	0	0	158184	227487	66868	116304	126480
10	0	0	0	152675	212019	69286	112175	121437
11	0	0	0	167107	229945	73394	121277	134770

Figura 3.16 - Diagrama de Pareto para os efeitos estimados das variáveis e suas interações para o planejamento fatorial 2^3 + ponto central para a DESI gerado através do software STATISTICA 6.0.

O **tempo** é a única variável de acordo com o modelo que apresenta influência na extração. Atua de maneira positiva, ou seja, o aumento do tempo produz um aumento na extração concordando, assim, com dados da literatura, pois a SPME baseia-se na partição do analito entre duas fases requerendo, portanto, tempo necessário para que haja sorção do analito na fibra.

A **temperatura** também apresenta efeito positivo sobre a extração, porém segundo o modelo não apresenta influência significativa na extração. O aumento da temperatura em SPME atua de dois modos na extração, aumentando a difusão dos analitos e, como consequência, aumentando a extração e diminuindo o coeficiente de partição do analito entre a fibra e a matriz, diminuindo a extração. No caso dos antidepressivos, o efeito que predomina é o da difusão, pois esta apresenta um valor

positivo no diagrama de efeitos estimado, que apesar de não significativa colabora para o aumento da extração dos compostos.

O **pH** também apresenta um efeito positivo sobre a extração, porém como a temperatura este efeito não é significativo segundo o modelo utilizado.

A interação das variáveis **2 e 3** (tempo e pH) é positiva, ou seja, há aumento da extração quando tempo e pH são aumentados em conjunto. Com relação às interações entre as variáveis **1 e 3** (temperatura e pH) e **1 e 2** (tempo e temperatura) estas apresentam efeito negativo, ou seja, quando estas variáveis caminham no mesmo sentido há uma diminuição da extração.

Além, do diagrama de Pareto foram gerados utilizando o software STATISTICA os gráficos de superfície e do perfil de resposta. Os gráficos de superfície de respostas (**Figura 3.17**) é um conjunto de técnicas de planejamento e análise de experimentos que utiliza a modelagem matemática de resposta em função dos fatores de controle, cujo objetivo é otimizar a resposta, ou seja identificar quais são os níveis dos fatores para os quais a resposta é otimizada.

Figura 3.17- Superfícies de resposta para os ADTs na concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ do planejamento fatorial 2^3 + ponto central: a) efeitos do tempo e da temperatura para o pH 11, b) efeitos do pH e da temperatura para o tempo de 45 minutos, c) efeitos do pH e do tempo para a temperatura de 30°C .

Como apresentado na **Figura 3.17A e B**, a temperatura deve ser ajustada em um valor baixo. Mesmo com um efeito positivo, como é apresentado no diagrama de Pareto (**Figura 3.16**), quando ocorre a interação da temperatura com o tempo, a melhor escolha é um valor de temperatura baixa. Este fato ocorre porque quando o tempo é colocado no nível alto, há tempo suficiente para a difusão dos analitos na fase extratora. A **Figura 3.17B e C** ilustra o efeito do pH que deve ser ajustado em nível alto e, por este motivo, esta variável deve ser analisada com muita cautela. A

análise de espécies ionizáveis, como é o caso dos antidepressivos que possuem um caráter básico (pK_a em torno de 9,5 a 10,7) exige que o pH do meio seja controlado. Este procedimento, garante que a maior parte das moléculas dos analitos presentes no meio esteja em sua forma neutra (não protonada), pois em SPME somente a forma não ionizada será extraída pelo recobrimento. Porém, os recobrimentos disponíveis em SPME abrangem somente um faixa de pH de 2-11 para a grande maioria, com exceção, da PDMS (100 μ m) que é de 2-10 e a CW/DVB que é de 2-9, não sendo possível usar valores de pH extremos (menor que 2 e maior que 11), o que acarretaria em danos permanentes no recobrimento da fibra de SPME. Como neste planejamento fatorial o recobrimento utilizado foi o PDMS/DVB (60 μ m) o pH limite é 11. Neste pH 11 os ADTs IMI e AMI (pK_a 9,5 e 9,4) e DESI e NOR (pK_a 10,2 e 10,8) estão predominantemente na forma neutra produzindo, assim, condições adequadas para a extração destes fármacos. A interação entre pH e temperatura é negativa (**Figura 3.16**), e a influência do pH na quantidade de extração é predominante em temperatura baixa, como pode ser observado na **Figura 3.17B**. Esta interação pode ser causada pelo fato que, em temperatura baixa o coeficiente de partição é maior. Assim, quando o pH é elevado, e os analitos estão na sua forma neutra, a quantidade de extração é aumentada se comparada com a mesma situação em uma temperatura alta. Do mesmo modo, a **Figura 3.17C** ilustra que quando o tempo é suficientemente alto os analitos, neutralizados pelo pH elevado, são melhores extraídos. Sumarizando, este diagrama ilustra que para aumentar a extração é necessário manter o tempo e pH em valores altos e temperatura valor de baixo.

O gráfico do perfil de resposta (**Figura 3.18**) apresenta o resultado final quando os dados obtidos com todos os fármacos são analisados em conjuntos buscando qual seria o melhor ponto para executar os experimentos e obter uma alta eficiência de extração. A linha tracejada vertical na figura indica a melhor temperatura, tempo e pH. O cálculo produzido pelo STATISTICA, indicou que mais de 93% de resposta esperada foi obtido com os parâmetros com todos os analitos quando computados ao mesmo tempo.

Deste modo, a condição que proporcionou a resposta mais satisfatória foi: temperatura de 30 °C, tempo de extração de 45 minutos e pH 11. O cromatograma referente a SPME realizada nestas condições esta apresentado na **Figura 3.19**.

Figura 3.18 - Gráfico do perfil de resposta gerado pelo software STATISTICA envolvendo todos os ADTs para as condições otimizadas.

Figura 3.19 - Cromatograma dos ADTs utilizando a SPME no modo "on-line" na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$: (1) desipramina, (2) nortriptilina, (3) imipramina, (4) amitriptilina, (PI) clomipramina.

3.4.2.3 - FIBRAS "LABMADE"

As fibras "Labmade" testadas neste trabalho foram produzidas durante o trabalho de doutorado da aluna Cristina Alves Lacerda (Desenvolvimento de fibras para a microextração em fase sólida (SPME): caracterização e aplicação) desenvolvido no laboratório de Cromatografia. Neste trabalho foram realizadas aplicações com matrizes ambientais (pesticidas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos-PAH's), biológicas (plasma -PAH's e soro -nitro-PAH's) e alimentícias (essência oleosa de laranja), obtendo-se bons resultados de extração com as fibras utilizadas.

3.4.2.1- FIBRAS DE SÍLICA MODIFICADA

A sílica é um material poroso que possui uma grande área superficial, na qual os analitos são adsorvidos temporariamente. Os sítios ativos na superfície da sílica podem ser quimicamente modificados com diferentes grupos alquílicos, este procedimento proporciona seletividade e amplia a aplicação da sílica para extração de diversos compostos.

Para avaliar os resultados obtidos com as fibras de sílica modificada quimicamente com os grupos metil (C_1) e octadecilsilano (C_{18}) com diâmetros de partícula de 3,5 e 10 μ m e, estudar a influência das variáveis (tempo de extração, temperatura, pH e adição de eletrólito) sobre a variável resposta (área dos picos), foi utilizado um planejamento fatorial 2^{4-1} (8 experimentos). A eficiência da extração dos ADTs expressa pela área dos picos cromatográficos com as 3 fibras é apresentada na **Figura 3.20**.

Figura 3.20 – Eficiência de extração expressa pela área dos picos ADTs para as fibras “labmade”.

Nas fibras de sílica modificada o processo de extração predominante é a adsorção, sendo que, a quantidade extraída do analito é proporcional a superfície de área do grupo ligado a matriz da sílica, ao número de carbono, do diâmetro médio da partícula e do diâmetro de seus poros.

Os resultados obtidos evidenciam esta afirmação, pois observou-se que na fibra de C₁₈ com a mudança do diâmetro da partícula, ou seja, a superfície da área disponível para extração, houve uma diminuição grande da quantidade extraída dos fármacos antidepressivos. Quando mudou-se o número de átomos de carbono ligados a sílica, de C₁₈ para C₁ somente o antidepressivo imipramina foi extraído, mas uma quantidade menor que o extraído pela fibra C₁₈ (10μm). Os resultados obtidos para cada ADTs e matriz do planejamento fatorial estão apresentados na **Tabela 3.10**.

Tabela 3.10 - Matriz de planejamento fatorial 2^{4-1} com as respostas para os ADTs obtidos por SPME-LC “off-line” com a fibra C₁₈ (10 µm).

Ensaio	Temp °C	Tempo (min)	pH	NaCl (%)	DESI	NOR	IMI	AMI	CLOMI
Áreas cromatográficas dos ADTs									
1	-1	-1	-1	-1	29219	31569	38832	44189	
2	+1	-1	-1	+1	20352	22034	29573	38028	
3	-1	+1	-1	+1	13983	14616	19253	24707	
4	+1	+1	-1	-1	41114	46199	55480	59211	
5	-1	-1	+1	+1	16076	17334	26434	35224	
6	+1	-1	+1	-1	48366	52299	63951	63835	
7	-1	+1	+1	-1	74067	76979	89373	92290	
8	+1	+1	+1	+1	27012	31144	39197	44336	

Após o término dos experimentos com a fibra “lab made” C₁₈ (10µm), esta apresentou excelentes resultados para os antidepressivos. As condições de otimização foram iguais aquelas obtidas para a fibra comercial PDMS (100µm), apesar das características diferentes entre essas fibras, pois o PDMS é um polímero líquido, sendo que o coeficiente de partição das moléculas orgânicas neste polímero é próximo aos observados para os solventes orgânicos. Portanto, o mecanismo predominante é a absorção. Já no caso da sílica, a sua superfície contém grupos ativos (sítios onde ocorre a adsorção) que interagem com os analitos. Foi observado também que houve uma maior extração dos compostos com esta fibra quando comparado a PDMS (100µm).

A influência dos efeitos tempo de extração, temperatura, pH e efeito de sal, foram iguais aos obtidos com a fibra PDMS/DVB (60µm) sendo, por isso, não discutido detalhadamente para a fibra C₁₈.

Foram plotados os gráficos dos planos de respostas (**Figura 3.21**) envolvendo todos os antidepressivos. Estes gráficos mostram que, para obter maior valor de área dos picos dos ADTs é necessário um ↑ tempo, uma ↓ temperatura, um ↑ valor de pH e a não adição de sal. Deste modo, a condição que proporcionou a resposta mais satisfatória foi: tempo de extração 30 minutos, temperatura de 30 °C, pH 8,0 e a não adição de NaCl. É preciso observar também, assim como no caso da fibra PDMS/DVB, que o modelo prediz que em pH maior que o testado obtém-se melhores resultados. Na prática isto não é possível, pois a fibra C₁₈ é também limitada com relação ao seu valor de pH. O cromatograma referente a SPME realizada nestas condições para a fibra C₁₈, está apresentado na **Figura 3.22**.

Figura 3.21 - Plano de resposta para os ADTs da SPME para otimização da resposta (área dos picos) com a fibra C_{18} : a) efeito do tempo com a temperatura, b) efeito do pH, da temperatura e do tempo, c) efeito do sal, da temperatura, do tempo e do pH.

Figura 3.22 - Cromatograma obtido nas condições para SPME, da mistura dos antidepressivos, na concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, em plasma. Fibra "lab made" C_{18} ($10 \mu\text{m}$ – diâmetro da partícula), tempo de extração (30 min.), temperatura (30°C), tampão carbonato de sódio 60 mmol L^{-1} (pH 8) e com agitação de 1200 rpm. 1) desipramina, 2) nortriptilina, 3) imipramina, 4) amitriptilina e 5) clomopramina (padrão interno).

3.4.2.4 - CONCLUSÕES

A escolha da fibra é o primeiro passo em uma metodologia de SPME para a obtenção de bons resultados. Para a seleção da melhor fibra foram realizados experimentos qualitativos para avaliar o desempenho dos recobrimentos das fibras disponíveis de PDMS (100 μm), PA (85 μm), PDMS/DVB (60 μm), CAR/PDMS (75 μm). O melhor resultado foi obtido com a fibra PDMS/DVB (60 μm), sendo esta fibra indicada para extração de amins como o caso dos antidepressivos estudados, que são amins secundarias (NOR e DES) e terciárias (AMI e IMI).

A avaliação feita com a fibra PDMS/DVB (60 μm) das variáveis tempo de extração, temperatura e pH sobre a resposta (área do pico) para os ADTs, foi efetuado através de um planejamento fatorial 2^3 + ponto central. De acordo com o modelo empírico obtido, a condição que proporcionou a resposta mais satisfatória para a extração do ADTs foi: tempo de extração 30 minutos, temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$, pH 11 e a não adição de sal.

Nos testes feitos com as fibras sílica modificada quimicamente com os grupos metil (C_1) e octadecilsilano (C_{18}) com diâmetros de partícula de 3,5 e 10 μm , houve uma maior extração com a fibra C_{18} de 10 μm (diâmetro da partícula). Os resultados obtidos com esta fibra foram superiores aos que foram conseguidos com as fibras PDMS (100 μm), PA (85 μm) e CAR/PDMS (75 μm). Com relação à influência das variáveis (tempo de extração, temperatura, pH e adição de sal) sobre a variável resposta, foi feito um planejamento fatorial 2^{4-1} (8 experimentos). Os melhores resultados foram obtidos com as condições: tempo de extração 30 minutos, temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$, pH 8 e a não adição de sal.

3.4.3 - ANTICONVULSIVANTES

3.4.3.1 - SELEÇÃO DE FIBRAS PARA OS ACVS

Para a seleção foram realizados experimentos qualitativos para avaliar o desempenho das fibras (Supelco) comercialmente disponíveis, PDMS (100 μm), PA (85 μm), PDMS/DVB (60 μm), CW/TPR (50 μm). Para selecionar a melhor fase extratora, a extração foi realizada em um tempo de 30 minutos, com temperatura ambiente e tampão fosfato de potássio com a dessorção feita “on-line” por um período de 20 minutos. A eficiência da extração dos anticonvulsivantes expressada pela área dos picos cromatográficos com as 4 fibras é apresentada na **Figura 3.23**.

Após os experimentos, observa-se que as fibras PDMS e PA que possui camada polimérica homogênea apresentaram uma eficiência de extração um pouco menor que as fibras CWB/TPR e PDMS/DVB. Uma dos motivos para este aumento observado nestas fibras, que tem camada polimérica mista (resina TPR e copolímero DVB), é que elas têm a capacidade de retenção aumentada devido ao efeito mutuamente potencializado da adsorção e partição da fase estacionária. Ao comparar os resultados obtidos com estas duas fibras, observa-se que não houve uma diferença muito relevante entre elas com relação à eficiência de extração. Logo, para a otimização dos parâmetros que afetam a extração em SPME foi utilizado a fibra PDMS/DVB (60 μm).

Figura 3.23 - Eficiência de extração expressa pela área dos picos para os ACVs.

3.4.3.2 - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA SPME

Com a escolha da fibra, a etapa seguinte consistiu em estudar os parâmetros que influenciam na SPME. A quantidade extraída não depende somente da polaridade ou espessura do recobrimento, mas também do tempo e temperatura de extração, agitação e pH da solução e adição de eletrólito. Diante deste fato, foi realizado um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} com a fibra PDMS/DVB (60 μm). A matriz de contraste, as variáveis estudadas e resultado obtido para cada ACVs com a fibra PDMS/DVB estão apresentados na **Tabela 3.11**.

Tabela 3.11 – Matriz de planejamento fatorial 2^{4-1} + ponto central com as respostas para os ACVs obtidos por SPME-LC “on-line” com a fibra PDMS/DVB (60 μm).

Ensaio	Temp. °C	Tempo (min.)	pH	NaCl (%)	FENO	EPOXI	FENI	CARBA	HIDAN
1	-	-1	-1	-1	97712	42306	258698	172036	374684
2	+	-1	-1	+1	122064	7986	24605	21976	258391
3	-	+1	-1	+1	176974	51209	253388	213458	895287
4	+	+1	-1	-1	37983	9658	34690	24802	430868
5	-	-1	+1	+1	48407	83069	186640	298773	381431
6	+	-1	+1	-1	33510	33435	59224	138079	109579
7	-	+1	+1	-1	95962	37554	118388	156345	207208
8	+	+1	+1	+1	4666	65127	180648	255319	407752
9	0	0	0	0	132469	56938	258459	225713	559892
10	0	0	0	0	89480	20878	41893	41897	627943
11	0	0	0	0	78374	10511	34403	29804	515374

Com os resultados obtidos para os anticonvulsivantes, foram plotados os gráficos das superfícies de respostas (**Figura 3.24**). Os gráficos (a, b, c, d e f) mostram os efeitos das interações das variáveis tempo de extração, temperatura, pH e efeito do eletrólito. De acordo com este modelo empírico, para obter-se um maior valor de área dos picos dos anticonvulsivantes é necessário um tempo intermediário, temperatura baixa, valor de pH baixo e adição de NaCl.

Figura 3.24 – Superfícies de respostas para os ACVs obtidos com a SPME para otimização da resposta (área dos picos) com a fibra PDMS/DVB (60 μ m): (a) efeito do tempo com a temperatura, (b) efeito do pH com a temperatura, (c) efeito do pH com o tempo, (d) efeito do eletrólito (NaCl) com a temperatura, (e) efeito do eletrólito com o tempo e (f) efeito do eletrólito com o pH.

Fazendo-se uma análise, mais detalhada dos efeitos obtidos com cada variável estudada, observa-se que o efeito tempo de extração, que é definido como o tempo necessário para que ocorra o equilíbrio entre as fases, teve um efeito positivo na quantidade extraída quando aumenta-se o tempo de extração de 10 para 30 minutos, permanecendo constante como apresentado nos gráficos da **Figura 3.24**, que prediz um maior aumento da quantidade extraída com o aumento do tempo de extração quando ocorre interação com outros efeitos.

Já o efeito da temperatura mostrou-se menor quando comparado com o tempo de extração, ou seja, o aumento temperatura de 30 °C para 60 °C para os ADTs em questão não contribui tanto para o aumento da quantidade extraída destes fármacos.

A análise de espécies ionizáveis, como é o caso dos anticonvulsivantes, exige o controle do pH do meio, realizado através do uso de solução tampão. Este procedimento garante que a maior parte das moléculas dos analitos presentes no meio estejam em sua forma neutra (não protonada), pois em SPME somente a forma não ionizada será extraída pelo recobrimento.

Para todos os compostos, o efeito da adição de NaCl foi positivo, ou seja, havendo um aumento na resposta quando se passa da condição (-, sem sal) para a adição de NaCl (+, 30%).

Deste modo, de acordo com este modelo empírico, a condição que proporcionou a resposta mais satisfatória para a extração do anticonvulsivantes (**Figura 3.25**) foi: tempo de extração de 30 minutos, temperatura de 30 °C, pH 5 e adição de 30 % de NaCl. O cromatograma referente a SPME realizada nestas condições esta apresentado na **Figura 3.26**.

Figura 3.25 - Gráfico do perfil de resposta gerado pelo software STATISTICA envolvendo os ACVs fenobarbital, fenitoína, carbamazepina e epóxido-carbamazepina para as condições otimizadas.

Figura 3.26 – Cromatograma ilustrando uma extração obtida com o acoplamento SPME/LC, da mistura dos fármacos ACVs, na concentração de 10 mg L⁻¹: 1) fenobarbital; 2) epóxido-carbamazepina; 3) fenitoína; 4) carbamazepina; 5) hidantoína (padrão interno).

3.4.3.3 - CONCLUSÕES

Para a seleção da melhor fibra foram realizados experimentos qualitativos para avaliar o desempenho dos recobrimentos das fibras disponíveis de PDMS (100 μm), PA (85 μm), PDMS/DVB (60 μm), CW/TPR (50 μm). O melhor resultado foi obtido com a fibra PDMS/DVB (60 μm).

A avaliação feita com a fibra PDMS/DVB (60 μm) das variáveis tempo de extração, temperatura, adição de eletrólito e pH sobre a resposta para os ACVs, foi efetuado através de um planejamento fatorial 2^{4-1} + ponto central. De acordo com modelo empírico obtido, a condição que proporcionou a resposta mais satisfatória para a extração do ACVs foi: tempo de extração 30 minutos, temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$, pH 5,0 e a adição de 30 % de NaCl.

3.5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MILLS, G.A.; WALKER, V. Headspace Solid-phase Microextraction Procedures for Gas Chromatographic Analysis of Biological Fluids and Materials. **J. Chromatogr. A**, v.902, p.267-287, 2000.
2. PROZEN, H.; KRALJ, L.Z. Solid Phase Microextraction. **Trends Anal. Chem.**, v. 18, n. 4, p. 272-282, 1999.
3. RODRÍGUEZ, I.; CARPINTERIRO, J.; QUINTANA, J.B.; CARRO, A.M.; LORENZO, R.A.; CELA, R. Solid-phase Microextraction with on-fiber Derivatization for the Analysis of Anti-inflammatory Drugs in Water Samples. **J. Chromatogr. A**, v. 1024, p. 1-8, 2004.
4. Iwai, M.; Hattori, H.; Arinobu, T.; Ishii, A.; Kumazawa, T.; Noguchi, H.; Suzuki, O.; Seno, H. Simultaneous determination of barbiturates in human biological fluids by direct immersion solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **J. Chromatogr. B**, v. 806, p. 65-73, 2004.
5. QUEIROZ, M.E.C.; LANÇAS, F.M. Solid-phase Microextraction-liquid Chromatography (SPME_LC) Determination of Lamotrigine Simultaneously with Carbamazepine and Carbamazepine 10,11-epoxide in Human Plasma. **J. Sep. Sci.** 25, 91-95, 2002.
7. QUEIROZ, M.E.C.; LANÇAS, F.M. Análise de Fármacos em Material Biológico: Acoplamento Microextração em Fase Sólida “No Tubo” e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Quim. Nova**, v. 28, n.5, p. 880-886, 2005
8. LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of Drugs. **J. Chromatogr. A**, v. 902, p. 17-63, 2000.
9. PAWLISZYN, J. **Solid Phase Microextraction: Theory and Practice**. Ontario, Wiley-VCH, 1997. 247p.
10. LORD, H.; PAWLISZYN, J. Evolution of Solid-phase Microextraction Technology. **J. Chromatogr. A**, v.885, p.153-193, 2000.
11. KUMAZAWA, T.; LEE, X.P.; SATO, K.; SUZUKI, O. Solid-phase Microextraction and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry in Drug Analysis. **Anal. Chim. Acta**, v.492, p.49-67, 2003.

12. ULRICH, S. Solid-phase Microextraction in Biomedical Analysis. **J. Chromatogr. A**, v.902, p.167-194, 2000.
13. THEODORIDIS, G.; KOSTER, E.H.M.; JONG, G.J. Solid-phase Microextraction for the Analysis of Biological Samples. **J. Chromatogr. B**, v.745, p.49-82, 2000.
14. KATAOKA, H.; LORD, H. L.; PAWLISZYN, J. Applications of solid-phase microextraction in Food Analysis. **J. Chromatogra. A**, v.880, p.35-62, 2000.
15. SNOW, N.H. Solid-phase Micro-extraction of Drugs from Biological Matrices. **J. Chromatogr. A**, v.885, p.445-455, 2000.
16. PARREIRA, F.V.; CARDEAL, Z.L. Amostragem de Compostos Orgânicos Voláteis no Ar Utilizando a Técnica de Microextração em Fase Sólida. **Quim. Nova**, v. 28, p. 646-654, 2005
17. Yamada, Meire Yumi. **Caracterização de Aromas Cítricos Utilizando Microextração em Fase Sólida no Modo Headspace (Hs-Spme) e Cromatografia Gasosa**. 2003. 141 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.
18. QUEIROZ, M.E.C.; LANÇAS, F.M. Practical on Preparing Plasma Samples for Drug Analysis Using SPME. **LCGC North America** 22, 970-980, 2004.
19. LACERDA, CRISTINA APARECIDA. **Desenvolvimento de Fibras para a Micro Extração em Fase Sólida (SPME): Caracterização e Aplicação**. 2001. 127 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.
20. ULRICH, S.; MARTENS, J.; Solid-phase Microextraction with Capillary Gas-liquid Chromatography and Nitrogen-phosphorus Selective Detection for the Assay of Antidepressant Drugs in Human Plasma. **J. Chromatogr. B**, v.696, p.217-234, 1997.
21. SEMENOV, S.N.; KOZIEL, J.A.; PAWLISZYN, J.; Kinetics of Solid-phase Extraction and Solid-phase Microextraction in Thin Adsorbent Layer with Saturation Sorption Isotherm. **J. Chromatogr. A**, v.873, p.39-51, 2000.

22. CÁRDENES, L.; AYALA, J.H.; AFONSO, A.M.; GONZÁLEZ, V. Solid-phase Microextraction Coupled with High-performance Liquid Chromatography for the Analysis of Heterocyclic Aromatic Amines. **J. Chromatog. A**, v.1030, p.87-93, 2004.
23. ZAMBONIN, C.G. Coupling Solid-phase Microextraction to Liquid Chromatography. **Anal. Bioanal. Chem**, v. 375, p. 73-80, 2003.
24. BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Campina, Editora da Unicamp, 2002, 401p.
25. Deming, S.N.; Morgan, S.L. **Experimental design: a chemometric approach**, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1987, pp. 181-218.
26. Box, G.E.P.; Hunter W.G.; Hunter J.S. **Statistics for Experimenters**, John Wiley & Sons, New York, 1978, pp. 291-535.
27. Box, G.E.P.; Draper, N.R. **Empirical model-building and response surface**, John Wiley & Sons, New York, 1987, pp. 1-669.
28. RODRIGUES, J.C.; SANTOS NETO, A.J.; FERNANDES, C.; ALVES, C.; CONTADORI, A.S.; LANÇAS, F.M. Development of an improved heated interface for coupling solid-phase microextraction to high-performance liquid chromatography. **J. Chromatog. A**, v.1105, p.208-212, 2004.
29. ALVES, C.; FERNANDES, C.; SANTOS NETO, A.J.; RODRIGUES, J.C., QUEIROZ, M.E.C.; LANÇAS, F.M. Optimization of the SPME Parameters and its Online Coupling with HPLC for the Tricyclic Antidepressants Analysis in Plasma Samples. **J. Chromatogr. Sci**, "In Press".

CAPÍTULO 4

CROMATOGRAFIA LIQUÍDA ACOPLADA A

ESPECTOMETRIA DE MASSAS (LC/MS)

*Clamei ao Senhor com minha voz:
a Deus levantei a minha voz, e ele inclinou
para mim os ouvidos. (Salmo 77:1)*

4.1 - INTRODUÇÃO

Cromatografia combinada com várias técnicas de detecção é uma ferramenta poderosa muito utilizada para o desenvolvimento de métodos analíticos. Entre elas, destaca-se a cromatografia acoplada “on-line” com espectrometria de massas (MS) que combina a vantagem da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com a espectrometria de massas (informação estrutural e aumento de seletividade) ¹.

O surgimento da técnica cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) ocorreu no final da década de 60, quando foram iniciadas pesquisas preliminares em alguns laboratórios. Trabalhos pioneiros neste campo foram realizados pelos grupos de Tal’rose, Horning, e Scott enquanto que os desenvolvimentos posteriores na parte instrumental foram efetuados nos laboratórios de Arpino, Ishii, Vestal, Fenn e outros. Os objetivos iniciais que levaram ao desenvolvimento do acoplamento LC-MS foram os seguintes: i) possibilidade de análise de compostos termicamente instáveis e não voláteis, a qual não seria possível pela técnica cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS); ii) usar o detector seletivo de massas como detector universal em LC; iii) Evitar a derivatização do analito, recurso utilizado para aumentar a volatilidade dos analitos para que possam ser analisados por GC ².

A combinação de HPLC com MS é significativamente diferente da GC-MS. Ela é tecnicamente mais complexa e coloca muito mais restrições sobre a parte cromatográfica, tais como no fluxo e composição da fase móvel. Apesar dessas restrições a LC-MS tem se tornado uma técnica analítica valiosa com grande uso em laboratórios e na indústria farmacêutica nas mais variadas áreas ¹.

A análise de compostos orgânicos por espectrometria de massas envolve três processos principais: (i) a produção de uma fase gasosa carregada (com o analito na forma de íons protonados e fragmentos de íons) na fonte de íons do instrumento; (ii) a separação destes íons no analisador de massa, de acordo com razão massa/carga (m/z); (iii) finalmente, a medida da abundância relativa de cada um destes íons, realizada no detector ³.

As técnicas de ionização à pressão atmosférica (API) têm muitas vantagens em relação a outros métodos de ionização em MS. Na API-MS, a fonte de íons é localizada fora do espectrômetro, os íons são formados à pressão atmosférica e então introduzidos dentro do espectrômetro de massas. Esta é uma técnica de ionização branda (é formado somente o íon protonado), mas a aplicação de potencial elétrico na entrada do espectrômetro de massas pode criar condições para a produção de fragmentos iônicos.

As duas interfaces API mais utilizadas atualmente são: a de ionização química à pressão atmosférica (APCI) e a de ionização *electrospray* (ESI).

4.1.1 - IONIZAÇÃO QUÍMICA À PRESSÃO ATMOSFÉRICA (APCI) ^{3,4-11}

A ionização química à pressão atmosférica é um método de ionização desenvolvido para o acoplamento LC/MS, em que os íons do solvente são produzidos por um fluxo líquido à pressão atmosférica por uma descarga corona, que são gerados através de uma solução líquida volátil (água, metanol, etc) introduzida na fonte de íons, sendo nebulizada e vaporizada sob aquecimento. As moléculas do solvente ionizadas, então reagem com as moléculas da amostra produzindo o íon protonado ou os fragmentos dele. A formação de íon-positivos

pode ser realizada por transferência de próton, formação de aduto, ou reação de troca iônica, enquanto que os íons no modo íon-negativo são formados devido à transferência de próton (abstração), ligação de ânion ou reação de captura de elétrons.

A **Figura 4.1** mostra uma interface APCI-LC/MS. O efluente do sistema LC (0,5-2,0 mL min⁻¹) é introduzido no vaporizador e no dessolvatador. O vaporizador consiste de um capilar de aço inox que pode ser aquecido até 400 °C por dois cartuchos aquecedores. Os efluentes da coluna são rapidamente vaporizados através de um fluxo de nitrogênio e introduzidos na fonte de íons, onde a descarga corona (3-6 kV) gera os íons, conduzindo a uma variedade de reações íons-moléculas. Os íons são produzidos no espectrômetro de massas e atravessam a região de pressão intermediária localizada entre dois eletrodos cônicos com abertura estreita. A tensão é aplicada entre dois eletrodos para aumentar a eficiência de transmissão dos íons formados no espectrômetro de massas, e para dissociar grupos de íons em íons moleculares protonados.

Figura 4.1 - Diagrama esquemático da interface APCI (Ionização Química à Pressão Atmosférica) ^{3,6}.

4.1.2 - IONIZAÇÃO VIA ELECTROSPRAY (ESI) ^{3,7-17}

A ionização via electrospray é atualmente uma das mais importantes técnicas de ionização para acoplamento “on-line” da cromatografia líquida com espectrometria de massas. Ela é um método simples, que manuseia moléculas grandes e pequenas, operando a pressão atmosférica e em temperatura moderada, sendo provavelmente a técnica de ionização mais branda disponível para MS.

O funcionamento do sistema ESI-MS pode ser dividido em três etapas:

- nebulização da amostra em solução, formando gotículas carregadas eletricamente.
- liberação de íons provenientes das gotículas.
- transporte de íons da região da fonte de ionização à pressão atmosférica para dentro da região de vácuo, onde fica localizado o analisador de massas.

A interface ESI produz íons pela dessorção ou emissão de íons na forma de pequenas gotículas carregadas. Pequenas gotículas são carregadas através do aumento na força do campo aplicado e, posteriormente, os íons podem ser diretamente dessorvidos e o solvente evaporado. Uma vez que a ionização ocorre com a formação de gotículas líquidas nebulizadas à pressão atmosférica, ela é muito eficiente para o acoplamento direto com a LC.

Na interface ESI a solução da amostra passa através de um tubo capilar onde é aplicada uma intensa diferença de potencial (geralmente de 2-5 KV). Essa d.d.p. pode ser positiva ou negativa, de acordo com as características do composto analisado. No modo positivo, as cargas positivas são direcionadas à frente do líquido, formando o que é conhecido por cone de Taylor. Quando a repulsão eletrostática torna-se mais forte do que a tensão superficial do líquido (limite de Rayleigh), uma pequena gotícula eletricamente carregada deixa a superfície e migra

por meio do fluxo de gás em direção ao eletrodo reverso. O solvente na gotícula com auxílio de nitrogênio no modo “counter –current”, entre a ponta do capilar e a fonte de íons, permitindo a dessolvatação das gotículas carregadas e a formação de íons na fase gasosa. Quando o gás nebulizador não é utilizado, a interface é chamada de ESI convencional, e a vazão da solução é restrita entre 2-20 $\mu\text{L min}^{-1}$.

As vantagens da nebulização pneumática auxiliar são: (1) auxiliar na formação das gotículas; (2) produzir íons estáveis em uma ampla faixa de vazão de fase móvel (de 1 $\mu\text{L min}^{-1}$ até valores maiores que 1 mL min^{-1}); e (3) permitir o uso de gradientes (100% água até 100% de acetonitrila) e o uso de modificadores como o ácido fórmico, usado neste trabalho. A **Figura 4.2** está ilustra o mecanismo de funcionamento ESI-LC/MS.

Figura 4.2 - Diagrama esquemático do mecanismo de funcionamento ESI-LC/MS ¹⁸.

4.1.3 - ANALISADOR DE MASSAS

Imediatamente após a ionização, os íons em fase gasosa entram na região do espectrômetro de massas conhecida como analisador de massas, sendo este considerado o coração de um espectrômetro de massas. O analisador de massas, que fica em uma região de alto vácuo, é usado para separar íons dentro de uma faixa selecionada de razão massa-carga (m/z). Os íons são, tipicamente, separados por campos magnéticos, campos elétricos, ou medindo-se o tempo que eles levam para percorrer uma distância fixa ^{3,19}.

A ionização à pressão atmosférica pode ser acoplada com diferentes analisadores (quadrupolo, ion trap, eletromagnético e tempo de voo) e diferentes configurações de interfaces API para vários tipos de instrumentos são disponíveis comercialmente ³.

4.1.3.1- ANALISADOR DE MASSAS DO TIPO QUADRUPOLO

Em HPLC-MS, analisadores do tipo quadrupolo são os mais usados, principalmente porque eles apresentam algumas vantagens primárias, como a tolerância a vácuos relativamente baixos (5×10^{-5} torr), tornando-os adequados ao uso em ESI ou APCI (onde os íons são produzidos a pressão atmosférica), além do baixo custo dos espectrômetros que utilizam este analisador quando comparados a outros tipos de analisadores ¹⁹.

Um analisador de massas quadrupolar (**Figura 4.3**) é composto por quatro barras paralelas (quadrupolo), que são arranjadas eqüidistantes de um eixo imaginário central. Estas barras estão sujeitas a uma diferença de potencial. Em um instrumento de quadrupolo somente campos elétricos são usados para separar os íons de acordo com suas razão m/z . Os íons passam ao longo do eixo central das

quatro barras paralelas (eixo z), porém oscilam de modo complexo nas direções x e y, devido à aplicação simultânea de corrente contínua (DC) de voltagem V_{DC} e radiofrequência (RF) de voltagem V_{RF} nos pólos. Existe uma oscilação estável para um íon específico, com uma razão m/z , permitindo que este alcance a extremidade do quadrupolo sem tocar nos pólos. Já os íons indesejados, colidem com os pólos ou são arremessados para fora destes e são automaticamente destruídos³.

Figura 4.3 - Esquema ilustrativo de um analisador do tipo quadrupolo^{18,19}.

4.1.3.2 - ANALISADOR DE MASSAS DO TIPO CAPTURA DE ÍONS ("ION TRAP")

Os analisadores do tipo captura de íons são equivalentes em eficiência aos do tipo quadrupolar, porém a sua vantagem é a maior sensibilidade, uma vez que todos os íons formados são detectados. Isto acontece porque, no quadrupolo, os íons com trajetória estável são transmitidos para o detector, enquanto os íons de trajetória instável são perdidos. No "ion trap", os íons permanecem aprisionados e só são detectados quando suas trajetórias se tornam instáveis,^{3,6}.

A **Figura 4.4** ilustra o princípio do "ion trap". Ele consiste de dois eletrodos hiperbólicos fechados, que normalmente estão sob potencial zero e duas seções hiperbólicas fechadas centradas em direção ao anel do filamento do eletrodo no qual é aplicado um potencial para gerar o campo eletrostático do quadrupolo. Todos os íons formados pelo pulso de elétrons ou outro método de ionização são aprisionados dentro do eletrodo pela aplicação de uma tensão durante a ionização. Uma mudança nas tensões aplicadas no anel do eletrodo faz com que os íons passem a adotar uma trajetória instável e saiam do "ion trap" na ordem crescente da razão m/z , quando podem ser então detectados.

Figura 4.4 - Esquema ilustrativo de um analisador do tipo “ion trap” ⁶.

4.1.3.3 - ANALISADOR DE MASSAS DO TIPO TEMPO DE VÔO (“TIME OF FLIGHT”)

A vantagem de se utilizar o analisador do tipo tempo de vôo é a capacidade de realizar análises de altas massas (na região de 10^5 Da). Usando uma tensão de aceleração constante, cada íon de diferente massa tem uma diferente energia cinética e conseqüentemente uma diferente velocidade. Desta forma, cada íon atravessa uma distância fixa em um tempo diferente. A **Figura 4.5** ilustra o princípio do analisador tipo tempo de vôo. Os íons são geralmente formados num período muito curto usando, por exemplo, dessorção pulsada a laser, e alcançam o detector em ordem crescente de massas ³.

Existem dois tipos de analisador tempo de vôo, o tipo linear e o tipo refletor. A resolução da análise pode ser melhorada com o uso do tipo refletor. O refletor é

utilizado para compensar a diferença nos tempos de vôo dos íons (de mesma carga) com diferentes energias cinéticas. Após viajarem através do tubo de vôo, os íons entram no refletor, suas posições são corrigidas de forma que todos os íons de mesma massa estejam no mesmo espaço e então são enviados até o detector, através do tubo de vôo. O analisador do tipo refletor, porém, apresenta menor sensibilidade quando comparado com o tipo linear, porque alguns íons são perdidos no refletor.

Figura 4.5 - Esquema ilustrativo de um analisador do tipo "tempo de vôo" ¹⁹.

4.2 - EXPERIMENTAL

4.2.1- REAGENTES E PADRÕES

Os padrões de antidepressivos Cloridrato de Amitriptilina, Cloridrato de Imipramina, Cloridrato de Nortriptilina e Cloridrato de Desipramina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinhein, Germany). Para o preparo das soluções estoque, pesou-se 10 mg de padrão de cada composto e dissolveu-se em 5 mL de metanol. A partir das soluções estoques foram feitas as diluições necessárias para os experimentos.

Os padrões de anticolvulsivantes (primidona, carbamazepina, 10,11-epóxido-carbamazepina, fenitoína, fenobarbital e hidantoína (padrão interno)) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinhein, Germany). Para o preparo das soluções estoque, pesou-se 5 mg de padrão de cada composto e dissolveu-se em 5 mL de metanol. A partir das soluções estoques foram feitas as diluições necessárias para os experimentos.

Metanol e acetonitrila, grau HPLC, utilizados no preparo das soluções estoques e na fase móvel foram adquiridos de Mallinckrodt (Paris, Kentucky, USA).

O sal acetato de amônio utilizado na fase móvel foi o adquirido da Mallinckrodt (Phillipsburg, New Jersey, USA).

4.2.2- EQUIPAMENTO

Para analisar os padrões de antidepressivos e anticolvulsivantes foi utilizado um espectrômetro de massas Platform LC da Micromass (Manchester, UK), acoplado a duas bombas de cromatografia líquida LC-10AD (Shimadzu, Japão) e um forno com controlador de temperatura da Waters (Manchester, UK).

Nas condições de análise dos **ADTs** utilizou-se uma coluna cromatográfica Zorbax C-18 (150 x 2,1mm, 5µm) para análise com a interface ESI, e uma coluna cromatográfica Shimadzu VP C-18 (150 x 4,6mm, 5µm) para a análise com a interface APCI, ambas operando no modo isocrático, utilizando como fase móvel tampão acetato de amônio 10 mmol L⁻¹ (pH 5,50):ACN (50:50 v/v), a sua vazão 0,25 e 0,8 mL min⁻¹ para ESI e APCI respectivamente e temperatura de análise de 35 °C.

Na análise dos **ACVs** utilizou-se uma coluna cromatográfica Zorbax C-18 (150 x 2,1mm, 5µm), para o uso com a interface ESI e uma coluna cromatográfica Shimadzu VP C-18 (150 x 4,6mm, 5µm), para o uso com a interface APCI, ambas operando no modo isocrático utilizando como fase móvel água:ACN (60:40 v/v), a uma vazão de 0,25 e 0,8 mL min⁻¹ para ESI e APCI respectivamente e temperatura de análise de 35 °C.

4.2.3 - PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA LC/MS

Testou-se a separação dos ADTs e ACVs variando-se a porção aquosa da fase móvel entre água, tampão acetado de sódio (10 mmol L⁻¹, pH 5,50), tampão acetato de amônio (10 mmol L⁻¹, pH 5,50) e mistura de água:ácido acético (pH 5,50), associadas a proporção adequada de acetonitrila. Além disso, testou-se a adição de trietilamina (10 mmol L⁻¹) nas soluções dos tampões, com posterior ajuste do pH para 5,50. Estudou-se, também, a influência das variáveis vazão do gás nebulizador (N₂) e energia do íon, por um método univariado. Ajustou-se a sintonia do analisador para resolução adequada e a voltagem da multiplicadora. Os padrões foram injetados, individualmente, na concentração de 0,5 mg L⁻¹ e volume de 10 µL para ambas as classes de fármacos, sendo obtidos os espectros de cada composto no modo SCAN nessas condições.

Para a análise dos antidepressivos e anticonvulsivantes por LC/MS foram testadas as duas interfaces, atualmente, mais utilizadas: Ionização Electrospray (ESI) e a Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI). Através de um planejamento fatorial foram determinadas as melhores condições para a análise dos ADTs por LC/MS. Para a interface ESI foram avaliados as variáveis: voltagem do capilar, voltagem do cone e temperatura da fonte; enquanto que para a interface APCI, foram avaliados a temperatura do vaporizador, voltagem da descarga corona e voltagem do cone. As análises dos ADTs por LC/MS foram feitas no modo de ionização positiva, tanto para ESI como para APCI. As análises dos ACVs por LC/MS foram feitas no modo do íon positivo (primidona, carbamazepina e 10,11-epóxido- carbamazepina) e no modo do íon negativo (fenitoína, fenobarbital e hidantoína), tanto para ESI como para APCI. A massa molecular e o íon protonado dos ADTs e dos ACVs monitorados estão apresentados nas **Tabelas 4.1 e 4.2**.

Tabela 4.1 – Massa molecular e íon protonado dos ADTs.

Compostos	Massa Molecular (u)	[M+H] ⁺
DESI	266,39	267,4
NOR	263,38	264,4
IMI	280,41	281,0
AMI	277,41	278,4
CLOMI	314,3	315,3

Tabela 4.2 – Massa molecular e íon protonado dos ACVs.

Compostos	Massa Molecular (u)	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
Primidona	218,3	219,3	-
Epóxido-carbamazepina	252,3	253,3	-
carbamazepina	236,3	237,3	-
Fenobarbital	232,2	-	231,2
Fenitoína	252,3	-	251,3
hidantoína	266,3		265,3

4.2.4 - PLANEJAMENTO FATORIAL PARA OS ADTS E ACVS

Para o estudo das condições de ionização, foram avaliadas a influência de 3 variáveis em ESI (voltagem do cone, voltagem do capilar e temperatura da fonte) e APCI (voltagem do cone, voltagem da descarga corona e temperatura do vaporizador) sobre a variável área dos picos dos fármacos ADTs e ACVs. Uma abordagem quimiométrica na elaboração dos experimentos foi empregada, através da utilização de um planejamento fatorial 2^3 + ponto central e configuração estrela. As **Tabelas 4.3 a 4.6** apresentam os níveis estudados para cada fator e suas respectivas codificações.

Tabela 4.3 - Níveis e variáveis que influenciam na variável resposta (área do pico) avaliada no planejamento fatorial dos ADTs para ESI

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	1,68
Voltagem do capilar (kV)	1,32	2,00	3,00	4,00	4,68
Temperatura da fonte (°C)	100	120	150	180	200
Voltagem do cone (V)	8	17	30	43	52

Tabela 4.4 - Níveis e variáveis que influenciam na variável resposta (área do pico) avaliada no planejamento fatorial dos ADTs para APCI.

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	1,68
Voltagem da descarga corona (kV)	1,32	2,00	3,00	4,00	4,68
Temperatura do APCI (°C)	132	200	300	400	468
Voltagem do cone (V)	8	17	30	43	52

Tabela 4.5 - Níveis e variáveis que influenciam na variável resposta (área do pico) avaliada no planejamento fatorial dos ACVs para ESI

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	1,68
Voltagem do capilar (kV)	1,50	2,11	3,00	3,89	4,50
Temperatura da fonte (°C)	120	134	155	176	190
Voltagem do cone (V)	14	17	22	27	30

Tabela 4.6 - Níveis e variáveis que influenciam na variável resposta (área do pico) avaliada no planejamento fatorial dos ACVs para APCI.

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	1,68
Voltagem da descarga corona (kV)	1,00	1,81	3,00	4,19	5,00
Temperatura do APCI (°C)	130	148	175	202	220
Voltagem do cone (V)	14	17	22	27	30

4.2.5 - MODELOS EMPÍRICOS

Os modelos matemáticos empíricos com ajuste da equação quadrática foram construídos no software STATISTICA 6.0, e seus resultados avaliados por análise de variância (ANOVA) e suas respectivas superfícies de resposta foram construídas nas condições otimizadas.

4.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A separação cromatográfica foi otimizada levando-se em consideração a resolução cromatográfica, simetria dos picos e tempo total de análise.

A energia do íon foi alterada desde 0,1 volts (V) até valores maiores do que 1V e não se observou modificações significativas na resposta do equipamento, assim, optou-se pelo ajuste em 1V que é o valor recomendado pelo manual de operações do equipamento. Ajustou-se as condições de baixa e alta resolução em 12,5 unidades arbitrárias para ambas, por assim permitirem uma adequada resolução. Estudou-se a influência da vazão do fluxo de N₂, que se mostrou influente até determinado nível, com posterior estabilização. Na faixa de 275 a 350L h⁻¹ as respostas apresentaram uma tendência crescente com o aumento da vazão, que se estabilizou a partir de 350L h⁻¹, sendo esta considerada a condição ótima.

4.3.1 - RESULTADOS PARA OS ADTs

ADTs apresentam separação trabalhosa, uma vez que tem suas estruturas muito semelhantes, como pode ser observado na Tabela 1. O conjunto DESI/NOR apresenta uma proximidade maior devido a sua similaridade (aminas secundárias) sendo seguido pelo conjunto IMI/AMI (aminas terciárias) que tem um grupo metila substituindo o hidrogênio, sendo portanto mais retidos.

Apesar da melhoria discutida no capítulo 2 (**2.8.2.2 - Escolha da fase móvel**) a trietilamina não pode ser utilizada em análises por LC/MS, uma vez que suprime drasticamente a ionização dos ADTs. Esse fenômeno é justificado pela característica básica, comum entre os analitos e a trietilamina, além da maior concentração da última na fase móvel, quando comparada com os analitos. Como a análise por API-

MS necessita de ionização, a trietilamina acaba por competir no processo, impedindo uma boa ionização dos analitos.

Comparativamente, a utilização de tampão acetato de amônio resultou em um perfil cromatográfico um pouco mais eficiente e simétrico que o do tampão acetato de sódio. Além disso, é preferível trabalhar-se com um tampão volátil em LC/MS, pois a deposição de sais provenientes de tampões não-voláteis provoca entupimentos do contra-eletrodo e/ou do cone. A melhor condição cromatográfica que se adequou ao sistema LC/MS foi a utilização de tampão acetato de amônio (10 mmol L⁻¹, pH 5,50) misturado com acetonitrila em proporção 50:50 v/v.

Após a escolha da melhor fase móvel, foram obtidos os espectros de massas, no modo de ionização positivo, para cada composto (modo SCAN), sendo que para todos os fármacos estudados foi possível observar a formação do íon protonado [M+H]⁺. Os espectros de massas para cada composto estão apresentados nas **Figuras 4.6 – 4.9**.

Figura 4.6 - Espectro de massas (LC/MS- ESI) obtido para a DESI (SCAN) na concentração de (0,5 mg L⁻¹).

Figura 4.7 - Espectro de massas (LC/MS- ESI) obtido para a NOR (SCAN) na concentração de (0,5 mg L⁻¹).

Figura 4.8 - Espectro de massas (LC/MS- ESI) obtido para a IMI (SCAN) na concentração de (0,5 mg L⁻¹).

Figura 4.9 - Espectro de massas (LC/MS- ESI) obtido para a AMI (SCAN) na concentração de (0,5 mg L⁻¹).

Figura 4.10 - Espectro de massas (LC/MS- ESI) obtido para a CLOMI (SCAN) na concentração de (0,5 mg L⁻¹).

Em espectrometria de massas, os parâmetros instrumentais, tais como, voltagem do cone, voltagem do capilar, temperatura da fonte e temperatura do APCI, influenciam muito na resposta, pois são estas variáveis responsáveis pelo processo de formação de íons, separação de carga, evaporação do solvente, fragmentação e liberação das gotículas para a fase gasosa.

Um estudo da voltagem do capilar é muito importante pois, é esta voltagem que irá fornecer um gradiente eletromagnético necessário para produzir a separação de cargas na superfície do líquido. A temperatura atua auxiliando na dessolvatação dos íons, assim como na eliminação de interferência do solvente constituinte da fase móvel. Já para a voltagem do cone, o aumento desta provoca o aumento da energia interna da molécula fazendo com que a probabilidade de fragmentação também aumente. Em voltagens mais baixas do cone, somente os íons protonados são observados.

O planejamento fatorial realizado foi completo e incluiu ponto central em triplicata e configuração estrela. As **Tabelas 4.7 e 4.8** apresentam as matrizes dos experimentos e os vetores de resposta (área) obtidos por ESI e APCI.

Tabela 4.7 – Matriz do planejamento fatorial 2^3 + ponto central e configuração estrela com a resposta dos ADTs obtidos em LC/MS-ESI.

Exp.	CAPILAR	TEMP	CONE	NOR	DESI	AMI	IMI	CLOMI
1	-1	-1	-1	$3,08 \times 10^6$	$2,72 \times 10^6$	$2,52 \times 10^6$	$2,61 \times 10^6$	$5,90 \times 10^5$
2	-1	-1	1	$1,56 \times 10^6$	$1,07 \times 10^6$	$1,60 \times 10^6$	$1,01 \times 10^6$	$2,43 \times 10^5$
3	-1	1	-1	$2,67 \times 10^6$	$2,11 \times 10^6$	$2,04 \times 10^6$	$1,89 \times 10^6$	$4,10 \times 10^5$
4	-1	1	1	$1,25 \times 10^5$	$3,36 \times 10^4$	$2,07 \times 10^5$	$1,79 \times 10^4$	$7,46 \times 10^3$
5	1	-1	-1	$2,71 \times 10^6$	$2,48 \times 10^6$	$2,22 \times 10^6$	$2,14 \times 10^6$	$4,85 \times 10^5$
6	1	-1	1	$1,26 \times 10^6$	$8,25 \times 10^5$	$1,23 \times 10^6$	$8,77 \times 10^5$	$2,02 \times 10^5$
7	1	1	-1	$3,22 \times 10^6$	$2,52 \times 10^6$	$2,33 \times 10^6$	$2,18 \times 10^6$	$5,24 \times 10^5$
8	1	1	1	$1,76 \times 10^5$	$4,93 \times 10^4$	$2,67 \times 10^5$	$2,57 \times 10^4$	$1,24 \times 10^4$
9	-1,68	0	0	$1,77 \times 10^6$	$1,02 \times 10^6$	$1,86 \times 10^6$	$8,99 \times 10^5$	$2,37 \times 10^5$
10	1,68	0	0	$1,49 \times 10^6$	$8,41 \times 10^5$	$1,45 \times 10^6$	$6,67 \times 10^5$	$2,23 \times 10^5$
11	0	-1,68	0	$2,18 \times 10^6$	$1,33 \times 10^6$	$2,10 \times 10^6$	$1,36 \times 10^6$	$3,52 \times 10^5$
12	0	1,68	0	$6,48 \times 10^5$	$2,15 \times 10^5$	$9,07 \times 10^5$	$1,69 \times 10^5$	$6,65 \times 10^4$
13	0	0	-1,68	$1,76 \times 10^6$	$1,50 \times 10^6$	$1,46 \times 10^6$	$1,52 \times 10^6$	$3,35 \times 10^5$
14	0	0	1,68	$1,56 \times 10^5$	$9,59 \times 10^4$	$1,26 \times 10^5$	$5,83 \times 10^4$	$1,49 \times 10^4$
15	0	0	0	$2,17 \times 10^6$	$1,27 \times 10^6$	$1,83 \times 10^6$	$1,25 \times 10^6$	$3,34 \times 10^5$
16	0	0	0	$1,85 \times 10^6$	$1,01 \times 10^6$	$1,98 \times 10^6$	$9,44 \times 10^5$	$2,76 \times 10^5$
17	0	0	0	$1,99 \times 10^6$	$1,12 \times 10^6$	$2,13 \times 10^6$	$9,11 \times 10^5$	$2,85 \times 10^5$

Tabela 4.8 – Matriz do planejamento fatorial 2^3 + ponto central e configuração estrela com a resposta dos ADTs obtidos em LC/MS-APCI.

Exp.	CORONA	CONE	TEMP	NOR	DESI	AMI	IMI	CLOMI
1	-1	-1	-1	$4,79 \times 10^7$	$4,23 \times 10^6$	$3,16 \times 10^6$	$3,22 \times 10^6$	$5,33 \times 10^5$
2	-1	-1	1	$2,49 \times 10^7$	$1,76 \times 10^7$	$1,61 \times 10^7$	$1,36 \times 10^7$	$2,33 \times 10^6$
3	-1	1	-1	$1,13 \times 10^5$	$5,18 \times 10^4$	$1,28 \times 10^5$	n.d	n.d
4	-1	1	1	$2,04 \times 10^5$	$1,05 \times 10^5$	$1,58 \times 10^5$	n.d	n.d
5	1	-1	-1	$2,36 \times 10^8$	$1,79 \times 10^8$	$1,20 \times 10^8$	$1,09 \times 10^8$	$2,02 \times 10^7$
6	1	-1	1	$1,76 \times 10^8$	$9,10 \times 10^7$	$9,18 \times 10^7$	$5,67 \times 10^7$	$1,20 \times 10^7$
7	1	1	-1	$1,58 \times 10^6$	$4,27 \times 10^5$	$2,84 \times 10^6$	n.d	n.d
8	1	1	1	$3,80 \times 10^5$	$1,70 \times 10^5$	$4,50 \times 10^5$	n.d	n.d
9	-1,68	0	0	$1,59 \times 10^6$	$5,90 \times 10^5$	$2,40 \times 10^6$	$5,11 \times 10^5$	$2,01 \times 10^5$
10	1,68	0	0	$3,01 \times 10^7$	$6,72 \times 10^6$	$3,78 \times 10^7$	$4,90 \times 10^6$	$2,25 \times 10^6$
11	0	-1,68	0	$8,77 \times 10^7$	$6,10 \times 10^7$	$3,67 \times 10^7$	$3,15 \times 10^7$	$5,28 \times 10^6$
12	0	1,68	0	$1,12 \times 10^5$	n.d	n.d	n.d	n.d
13	0	0	-1,68	$1,24 \times 10^7$	$4,91 \times 10^6$	$1,39 \times 10^7$	$3,92 \times 10^6$	$1,28 \times 10^6$
14	0	0	1,68	$8,99 \times 10^6$	$1,63 \times 10^6$	$1,74 \times 10^7$	$1,39 \times 10^6$	$5,08 \times 10^5$
15	0	0	0	$1,35 \times 10^7$	$2,58 \times 10^6$	$1,73 \times 10^7$	$1,91 \times 10^6$	$8,62 \times 10^5$

n.d= não determinado

Após testes para a escolha da interface, notou-se que a interface ESI possibilitou uma resposta melhor para os ADTs em comparação à interface APCI. Isso provavelmente deve-se a facilidade com que estes compostos são protonados em solução, ficando na forma $[M+H]^+$. Devido à esta observação, especial atenção foi destinada à otimização da interface ESI.

Com os resultados obtidos, utilizando o programa STASTICA (versão 6,0), foram gerados os diagramas de Pareto (**Figura 4.11**), as superfícies de respostas (**Figura 4.12**) e o perfil de respostas (**Figura 4.13**).

Figura 4.11 - Diagrama de Pareto para os efeitos estimados das variáveis e suas interações para o planejamento fatorial 2^3 ,+ ponto central e configuração estrela para os ADTs gerado através do software STATISTICA 6.0.

Na **Figura 4.11** é apresentado os diagramas de Paretos obtidos para cada fármaco ADTs com a influência de cada variável avaliada e sua interações sobre a quantidade extraída. A porcentagem de variação explicada pelo modelo para o planejamento 2^3 + ponto central e configuração estrela variou de 79 a 93 %, permitindo uma análise adequada. Para análise dos efeitos provocados por cada variável, foram avaliados apenas os termos lineares (L).

O cone foi a variável que apresentou a maior influência para todos os ADTs dentre as variáveis instrumentais estudadas. Ele atua de maneira negativa, e o seu aumento faz com que a resposta obtida para fármacos seja diminuída. Este efeito,

provavelmente, é provocado pela diminuição da intensidade dos íons protonados, que em voltagens maiores que 30 V, para o caso dos ADTs (**Figura 4.12 A**) diminuiu drasticamente devido a ocorrência de fragmentações (fenômeno de “*CID in source*” – dissociação induzida por colisão).

A variável temperatura apresentou influência para os fármacos AMI e IMI, mas em uma proporção menor a apresentada pelo cone e, também, atuou de maneira negativa. Em temperaturas altas, observou-se que ocorre instabilidade no *spray* provocado pela evaporação da fase móvel dentro do capilar dificultando, assim, a formação de um jato contínuo de *spray* necessário para uma análise adequada.

O capilar como as duas variáveis já estudadas, atuou de maneira negativa. Em “*electrospray*” o capilar promove a migração de cargas para a interface capilar/solução, formando uma dupla camada elétrica. Logo, quando o capilar é ajustado para valores altos, pode ocorrer não só a migração de cargas mas, também, pode provocar descarga corona, o que dificulta a obtenção de corrente constante de íons. O efeito de descarga corona ocorre quando elétrons livres presentes no gás são acelerados a uma velocidade suficiente para ionizar moléculas de gases presentes na câmara de ionização. A descarga corona diminui a intensidade dos íons do analito e os picos correspondentes às espécies geradas pela descarga aparecem com uma intensidade muito alta prejudicando, assim a análise dos compostos de interesse .

As variáveis voltagem do cone, voltagem do capilar e temperatura da fonte, quando gerada a superfície em três dimensões, mantendo-se uma das variáveis no seu ponto ótimo, apresenta efeitos mostrados na **Figura 4.12**.

Figura 4.12 - Superfícies de resposta para os ADTs utilizando a interface ESI no modo do íon positivo na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$: a) efeitos do capilar e da temperatura para a voltagem do cone de 14 V, b) efeitos da voltagem do cone e voltagem do capilar para a temperatura de 100°C c) efeitos da voltagem do cone e da temperatura para a voltagem capilar de 1,32 kV.

Pela **Figura 4.12 A e 4.12B** pode-se observar o efeito do capilar. Em regiões altas ou intermediárias, como observado na superfície de resposta, ocorre diminuição nas respostas obtidas para os fármacos. Já em regiões baixas, sua atuação é maximizada quando em associação com as demais variáveis aumentando, portanto, as respostas obtidas nestas condições.

A temperatura atua auxiliando na dessorção dos íons. Como mencionado por Moraes e Lago ¹², na interface “*electrospray*”, a temperatura deve ser mantida, preferencialmente, em valores baixos (tipicamente, de temperatura ambiente até 80°C), de forma a não gerar fragmentos. Assim, muitos dos íons gerados na fase

gasosa mantêm exatamente a mesma estrutura e carga das espécies em solução. Pela **Figura 4.12A e C** observa-se que esta variável deve ser mantida em valores de temperatura baixa.

O cone, por sua vez, é responsável pela transferência dos íons da fonte para o interior do espectrômetro. Na **Figura 4.12 B e C** podemos verificar sua atuação quando em associação com o capilar e a temperatura. Observa-se que, em temperaturas baixas, a utilização do cone baixo gera repostas adequadas para uma boa análise dos fármacos em questão, e que a utilização de cone alto e temperaturas altas reduz a resposta. Uma possível de interpretação deste fato, é atribuída a energia fornecida aos íons. Uma energia muito elevada do cone, associada à energia elevada fornecida por alta temperatura pode ocasionar fragmentações.

Após a análise das interações com os fármacos em estudo, foi construído o gráfico do perfil de resposta (**Figura 4.13**) nas condições otimizadas, onde a linha tracejada mostra qual é a melhor condição de voltagem de capilar, temperatura da fonte e voltagem do cone para obtenção dos melhores resultados.

Figura 4.13- Gráfico do perfil de resposta gerado pelo software STATISTICA envolvendo os ADTs para as condições otimizadas.

Com base nos resultados do modelo empírico obtido, as condições mais satisfatórias para separação de carga, formação do íon protonado, boa dessolvatação e transferência do íon formado para os ADTs foram: voltagem do capilar 1,32 kV, temperatura de 100 °C e voltagem do cone em 14 V. O cromatograma referente à otimização dessas variáveis, para os antidepressivos, está apresentado na **Figura 4.14**.

Figura 4.14 – Cromatograma do íon total obtido com a interface ESI, no modo de ionização positivo para os antidepressivos na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. (1) desipramina, (2) nortriptilina, (3) imipramina, (4) amitriptilina e (5) clomipramina.

4.3.2 - CONCLUSÕES

A escolha da composição da fase móvel em LC/MS deve ser feita com muita cautela. A presença de espécies iônicas não-voláteis tais como tampão fosfato ou sulfato podem resultar na completa perda da transmissão de íons devido à deposição destas espécies na forma de sal sobre a superfície metálica dentro do instrumento. Os melhores resultados foram obtidos usando tampão acetato de amônio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,50)/ ACN (50:50 v/v) com uma vazão de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$.

Duas interfaces API disponíveis comercialmente foram usadas: ionização química à pressão atmosférica (APCI) e ionização electrospray (ESI). Para avaliar a influência das variáveis independentes (voltagem do cone, voltagem do capilar e temperatura da fonte), tanto em ESI como em APCI, foi elaborado um planejamento fatorial 2^3 , com ponto central e configuração estrela. Com a análise dos dados obtidos, constatou-se que os melhores resultados de área dos picos cromatográficos foram obtidos com a Interface ESI, sendo que, através do modelo empírico obtido com o planejamento deve-se usar uma voltagem de capilar alto (1,32 kV), voltagem do cone baixo (14 V) e temperatura da fonte baixa (100°C), obtendo-se melhores condições para separação de carga, boa nebulização e formação do íon molecular para ADTs.

4.3.3 - RESULTADOS PARA OS ACVs

Foram feitos testes com relação ao modo de ionização (modo do íon positivo e negativo), mudando-se a fase móvel de tampão acetato de amônio/ACN (50:50 v/v) para água/ACN (60:40 v/v), onde observou-se uma melhora considerável na ionização e detecção destes compostos, mas não sendo possível a análise de todos os compostos no mesmo modo de ionização, devido ao fato dos compostos fenobarbital, fenitoína e hidantoína terem mais facilidade de perder um próton do que em ganhar. Deste modo, os compostos primidona, carbamazepina e 10,11-epóxido- carbamazepina forão analisados no modo do íon positivo e, fenobarbital, fenitoína e hidantoína no modo do íon negativo.

Os espectros obtidos para cada composto no modo de varredura SCAN estão apresentados nas **Figuras de 4.15 a 4.20**.

Figura 4.15 - Espectro de massas LC/MS-ESI (SCAN) no modo do íon positivo obtido para a primidona na concentração de (3 mg L^{-1}).

Figura 4.16 - Espectro de massas LC/MS-ESI (SCAN) no modo do íon negativo obtido para a fenobarbital na concentração de (0,5 mg L⁻¹).

Figura 4.17 - Espectro de massas LC/MS-ESI (SCAN) no modo do íon positivo obtido para a 10,11 epóxido carbamazepina na concentração de (0,5 mg L⁻¹).

Figura 4.18 - Espectro de massas LC/MS-ESI (SCAN) no modo do íon negativo obtido para a fenitoína na concentração de (0,5 mg L⁻¹).

Figura 4.19 - Espectro de massas LC/MS-ESI (SCAN) no modo do íon positivo obtido para a carbamazepina na concentração de (0,5 mg L⁻¹).

Figura 4.20 - Espectro de massas LC/MS-ESI (SCAN) no modo do íon negativo obtido para a hidantoína na concentração de (0,5.mg L⁻¹).

O planejamento fatorial 2³ realizado foi completo e incluiu ponto central em triplicata e estrela. A interpretação dos resultados foi feita com ajuste de equação quadrática. As variáveis estudadas, a matriz de contraste e resultados obtidos para cada fármaco estão apresentados na **Tabelas de 4.9 e 4.10**

Tabela 4.9 – Matriz de planejamento fatorial 2^3 + ponto central e configuração estrela com a resposta para os ACVs obtidos em LC/MS-ESI no modo do íon positivo (primidona, epóxido-carbamazepina e carbamazepina) e no modo do íon negativo (fenobarbital, fenitoína e hidantoína).

Exp.	Capilar	Temp	Cone	PRIMI	EPOXI	CARBA	FENO	FENI	HIDAN
1	-1	-1	-1	67636	347890	1769013	61598	78141	71743
2	-1	-1	1	69470	417650	2028713	50308	87205	82644
3	-1	1	-1	157588	341731	1712780	65937	101842	82049
4	-1	1	1	52794	891036	4596453	22432	76123	80861
5	1	-1	-1	189669	515326	3144314	305395	400570	354561
6	1	-1	1	82751	670156	3077231	176209	351003	398002
7	1	1	-1	608967	2090043	5690510	288550	348592	416416
8	1	1	1	98260	352936	1866129	99324	303052	361035
9	-1,68	0	0	125808	404121	2029947	43722	177219	212699
10	1,68	0	0	203068	863641	3700428	240446	415372	376796
11	0	-1,68	0	91269	548475	2067483	142428	203576	157248
12	0	1,68	0	121685	200888	1146577	42310	112057	113940
13	0	0	-1,68	169637	428212	2426278	124872	208551	219656
14	0	0	1,68	77091	491010	2768550	56608	210047	222001
15	0	0	0	163156	733232	3400992	175964	283205	280112
16	0	0	0	162200	664484	3417043	176758	284890	283128
17	0	0	0	163192	949785	3346541	174694	283674	284078

Tabela 4.10 – Matriz de planejamento fatorial 2^3 + ponto central e configuração estrela com a resposta para os ACVs obtidos em LC/MS-APCI no modo do íon positivo (primidona, epóxido-carbamazepina e carbamazepina) e no modo do íon negativo (fenobarbital, fenitoína e hidantoína).

Exp.	CORONA	TEMP	CONE	PRIMI	EPOXI	CARBA	FENO	FENI	HIIDAN
1	-1	-1	-1	n.d	1806	19764	2607	5780	4996
2	-1	-1	1	n.d	1529	17246	996	5962	7162
3	-1	1	-1	n.d	3777	33789	4120	11621	9896
4	-1	1	1	n.d	2343	24478	1400	9809	9896
5	1	-1	-1	57894	14643	97192	6306	8696	6814
6	1	-1	-1	14324	7920	72452	4271	10141	7980
7	1	1	-1	60261	17800	111292	7813	12116	8659
8	1	1	1	21026	9146	80593	4252	12009	9080
9	-1,68	0	0	n.d	2248	24687	1246	3918	3918
10	1,68	0	0	42158	15021	100076	4915	7816	6351
11	0	1,68	0	16948	5693	51794	4270	8890	6693
12	0	-1,68	0	16759	8006	75095	5965	13082	9811
13	0	0	1,68	42630	11007	61293	6212	8592	6601
14	0	0	-1,68	4400	3732	38481	1853	8513	7598
15	0	0	0	22299	9036	64844	5075	10159	8466
16	0	0	0	23847	8726	69534	5437	9807	8385
17	0	0	0	24968	8999	70043	5090	9578	8103

* n.d = não determinado

Com a obtenção dos resultados através dos planejamentos fatoriais, observou-se que as áreas obtidas dos fármacos em estudo na interface ESI foram maiores quando comparadas com a interface APCI. Essa diferença, provavelmente, é devido a facilidade com que estes compostos se protonam em solução, assim como a transferência dos íons para a fase gasosa, quando se utiliza a interface ESI. Observou-se também que o fármaco primidona, tanto na interface APCI como na ESI, não apresenta uma boa ionização quando comparado aos outros compostos, sendo necessário o aumento da sua concentração na solução de trabalho de 0,5 para 3 mg mL⁻¹. Este fato é coerente com dados da literatura, onde observa-se, principalmente no caso da ionização por ESI, que pode haver uma diferença bastante significativa na resposta entre diferentes analitos que possuem concentrações idêntica em solução, como foi constatado no caso dos anticonvulsivantes. Não houve, também, resposta para este composto quando utilizou-se a interface APCI em voltagens baixas de descarga corona. Devido a estas observações iniciais, especial atenção foi destinada a otimização da interface ESI. A análise dos resultados obtidos, utilizando o software STATISTICA 6.0 para os fármacos fenobarbital, fenitoína e hidantoína estão apresentados nas **Figuras 4.21 e 4.22.**

Figura 4.21 - Diagrama de Pareto para os efeitos estimados para o planejamento fatorial 2^3 + ponto central + estrela para os compostos fenitoína (a), fenobarbital (b) e hidantoína (c) no modo do íon negativo gerado através do software STATISTICA 6.0.

Figura 4.22 - Superfícies de resposta para os ACVs (fenobarbital, fenitoína e hidantoína) utilizando a interface ESI no modo do íon negativo na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$: a) efeitos do capilar e da temperatura para o cone de 21, b) efeitos do cone e do capilar para a temperatura de $155 \text{ }^{\circ}\text{C}$ c) efeitos do cone e da temperatura para o capilar de $4,50 \text{ kV}$.

A **Figura 4.21** apresenta o diagrama de Pareto para os efeitos estimados do planejamento fatorial para os anticonvulsivantes fenobarbital, fenitoína e hidantoína, sendo a porcentagem de variação explicada pelo modelo para o planejamento 2^3 variando de 84 a 94%, permitindo uma adequada avaliação da influência das variáveis estudadas. A linha tracejada indica a região acima da qual os efeitos são significativos (com limite de confiança de 95%).

Para os compostos fenobarbital, fenitoína e hidantoína, a variável voltagem do capilar (**Figuras 4.21, 4.22a e 4.22b**) apresenta influência significativa quando utilizado o modo do íon negativo, atuando de maneira positiva no processo de separação de carga em voltagens de capilar alta, proporcionando condições adequadas para a detecção dos íons formados. Isto está de acordo com teoria, pois em ESI o capilar é responsável pela voltagem que irá fornecer um gradiente eletromagnético necessário para produzir a separação de cargas na superfície do líquido. No caso do fármaco hidantoína, é a única variável que possui efeito significativo de acordo com a diagrama de Pareto (**Figura 4.21**).

O efeito da temperatura deve ser bem discutido e compreendido. A temperatura atua auxiliando na dessolvatação dos íons, assim como na eliminação de interferência do solvente constituinte da fase móvel. Pelas **Figura 4.21, 4.22a e 4.22c** observa-se que esta tem um efeito de tendência negativa. Isso se deve em sobremaneira a interação que ocorre entre as variáveis temperatura e cone, e que podem ser bem observadas na **Figura 4.22c**. Este acontecimento provavelmente tem origens múltiplas, uma vez que podem envolver processos de dessolvatação e fragmentação dos íons. Generalizando-se, observa-se que em temperaturas altas a utilização de cone alto reduz a resposta e em temperatura muito baixa a utilização de cone muito baixo também gera diminuição na resposta. Uma tentativa de interpretação do fenômeno pode considerar a energia fornecida aos íons. Uma energia muito elevada do cone associada à energia elevada fornecida por alta temperatura pode ocasionar fragmentações; por outro lado, baixa energia do cone associada a baixa temperatura não é suficiente para ejetar os íons das gotículas de maneira eficiente. O cone por sua vez, é o responsável pela transferência dos íons da fonte de ionização para o interior do espectrômetro. Levando-se em consideração

tudo o que foi discutido acima, a otimização dos fatores voltagem do cone e temperatura da fonte devem ser observados e otimizados em conjunto e as suas funções no equipamento devem ser consideradas.

Após a análise das interações com os fármacos em estudo, foi construído o gráfico do perfil de resposta (**Figura 4.23**) nas condições otimizadas, onde a linha tracejada mostra qual é a melhor condição de voltagem de capilar, temperatura da fonte e voltagem do cone para obtenção dos melhores resultados.

Figura 4.23- Gráfico do perfil de resposta gerado pelo software STATISTICA envolvendo os ACVs fenobarbital, fenitoína e hidantoína para as condições otimizadas.

Com base nos resultados do modelo empírico obtido, as condições mais satisfatórias para separação de carga, boa dessolvatação e transferência dos íons para os anticonvulsivantes fenobarbital, fenitoína e hidantoína foram: voltagem do capilar 4,50 kV (1,68), temperatura da fonte de 155 °C (ponto central) e voltagem do cone em 21 V (-0,84). O cromatograma referente à otimização desses parâmetros em LC/MS para os anticonvulsivantes está apresentado na **Figura 4.24**.

Figura 4.24 – Cromatograma do íon total obtido com a interface ESI, no modo de ionização positivo para os ACVs na concentração de 0,5 mg L⁻¹. (1) fenobarbital, (2) fenitoína e (3) hidantoína.

A análise dos resultados obtidos, utilizando o software STATISTICA 6.0 para os fármacos primidona, epóxido-cabamazepina e carbamazepina estão apresentados nas **Figuras 4.25 a 4.27**.

Figura 4.25 - Diagrama de pareto para os efeitos estimados para o planejamento fatorial 2^3 + ponto central + estrela para os compostos primidona (a), carbamazepina (b) e epóxido-cabamazepina (c) para o modo do íon positivo gerado através do software STATISTICA 6.0.

A **Figura 4.25** demonstra o diagrama de Pareto para os efeitos estimados do planejamento fatorial para os anticonvulsivantes no modo do íon positivo. A porcentagem de variação explicada pelo modelo obtido com o planejamento 2^3 foi de de 60% a 81%, permitindo uma adequada avaliação da influência das variáveis estudadas somente para a primidona, pois para a epóxido-carbamazepina e para a carbamazepina, a porcentagem de variação explicada ficou muito baixa quando utilizou-se o modelo quadrático para explicar as influências das variáveis. Como pode ser observado pelas **Figuras 4.25b e 4.25c**, a linha tracejada que indica a região acima da qual os efeitos são significativos (com limite de confiança de 95%) para estes compostos não indicou nenhum efeito estimado significativo. Provavelmente, para a melhor adequação do modelo para estes compostos talvez seja necessário o uso de modelo cúbico, pois na superfície de resposta destes fármacos deve haver inflexões que impossibilita uma boa variação explicada. Mas, como o comportamento das variáveis destes dois compostos são semelhantes aos da primidona, ou seja, o capilar atua de maneira positiva, o cone de maneira negativa e a temperatura da fonte de maneira positiva, podemos fazer uma análise aproximada do comportamento dos efeitos das variáveis estudadas, que deverá ser confirmado com a construção de modelos cúbicos para estes dois compostos utilizando o software MATLAB, pois o software STATISCA 6.0 não gera modelos cúbicos.

Na **Figura 4.25a**, as variáveis voltagens do capilar e do cone apresentam influência significativa quando utilizado o modo do íon positivo, mas atuando de maneira contrária, pois enquanto o cone atua de maneira negativa, o capilar atua de maneira positiva no processo de detecção dos íons formados. Já o efeito temperatura da fonte atua de maneira positiva, ou para estes compostos quando

utilizado o modo de ionização positiva é necessário o uso de temperaturas altas para auxiliar na dessolvatação dos íons, porém de acordo com o modelo não apresenta influência significativa. Mas como já discutido anteriormente quando feito a análise para os compostos fenobarbital, fenitoína e hidantoína, apesar de não possuir efeito significativo quando analisado separadamente, quando analisados em conjunto seus efeitos não podem ser negligenciados, pois cada um tem papel fundamental no resultado final, que é a detecção dos íons formados.

As variáveis temperatura da fonte, voltagens do cone e do capilar quando geradas a superfície resposta em três dimensões, mantendo-se uma das variáveis no seu ponto ótimo, são apresentadas na **Figura 4.26**. Quando o cone é mantido no ponto ótimo (**Figura 4.26a**) a melhor resposta é obtida em temperatura baixa e capilar alto; já quando a temperatura é mantida no seu ponto ótimo (**Figura 4.26b**) a melhor condição é obtida em capilar alto e cone baixo; e quando o capilar está no ponto ótimo (**Figura 4.26c**), deve-se usar temperatura alta e cone baixo.

Figura 4.26- Superfícies de resposta para os ACVs, utilizando a interface ESI no modo do íon positivo na concentração de $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ (primidona) e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (10,11-epóxido-carbamazepina e carbamazepina): a) efeitos do capilar e da temperatura para o cone de 14 V, b) efeitos do cone e do capilar para a temperatura de $158 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e c) efeitos do cone e da temperatura para o capilar de 4,50 kV.

Com base nestes resultados foi construído o gráfico do perfil de resposta (**Figura 4.27**), onde a linha tracejada mostra qual é a melhor condição de voltagem de capilar, temperatura da fonte e voltagem do cone para obtenção dos melhores resultados, observou-se que as condições que proporcionaram resultados mais satisfatórios para separação de carga, boa dessolvatação e transferência dos íons

para os anticonvulsivantes primidona, epóxido-carbamazepina e carbamazepina foram: voltagem do capilar 4,50 kV (1,68), temperatura da fonte de 158 °C (0,84) e voltagem do cone em 14 V (-1,68).

Figura 4.27 - Gráfico do perfil de resposta gerado pelo software STATISTICA envolvendo os ACVs primidona, epóxido-carbamazepina e carbamazepina para as condições otimizadas.

O cromatograma referente à otimização desses parâmetros em LC/MS para os anticonvulsivantes está apresentado na **Figura 4.28**.

Figura 4.28 – Cromatograma do íon total obtido com a interface ESI, no modo de ionização positivo para os ACVs na concentração de 3,0 mg L⁻¹ para: (1) primidona e 0,5 mg L⁻¹ para: (2) epóxido-carbamazepina, (3) carbamazepina.

4.3.4 - CONCLUSÕES

Duas interfaces API disponíveis comercialmente foram usadas: ionização química à pressão atmosférica (APCI) e ionização eletrospray (ESI). Para avaliar a influência das variáveis independentes (voltagem do cone, voltagem do capilar e temperatura da fonte) tanto em ESI como em APCI, foram elaborados planejamentos fatoriais 2^3 , com ponto central e configuração estrela. Com a análise dos dados obtidos constatou-se que os melhores resultados de área dos picos cromatográficos foram obtidos com a interface ESI.

Como não foi possível a análise de todos os compostos anticonvulsivantes no mesmo modo de ionização, devido ao fato dos compostos fenobarbital, fenitoína e hidantoína terem mais facilidade de perder um próton do que em ganhar, foi necessário realizar o planejamento fatorial 2^3 no modo do íon positivo e negativo, de modo que os compostos primidona, carbamazepina e 10,11-epóxido-carbamazepina foram analisados no modo do íon positivo e fenobarbital, fenitoína e hidantoína no modo do íon negativo.

Com os resultados obtidos através do planejamento fatorial, foram construídos os gráficos do perfil de resposta utilizando o software STATISTICA. As melhores condições de voltagem de capilar, temperatura da fonte e voltagem do cone proporcionaram uma boa separação de carga, dessolvatação e transferência dos íons para os anticonvulsivantes no modo do íon negativo para fenobarbital, fenitoína e hidantoína foram: voltagem do capilar 4,50 kV (1,68); temperatura da fonte de 155 °C (ponto central) e voltagem do cone em 21 V (-0,84). Para a primidona, epóxido-carbamazepina e carbamazepina, no modo do íon positivo foram: voltagem do capilar 4,50 kV (1,68); temperatura da fonte de 158 °C (0,84) e voltagem do cone em 14 V (-1,68).

4.4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. VEKEY, K. Mass Spectrometry and Mass-selective Detection in Chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 921, p.227-236, 2001.
2. NIESSEN, W.M.A.; TINKE, A.P. Liquid Chromatografia- Mass Spectrometry General Principles and Instrumentation. **J. Chromatogr. A**, v. 703, p.37-57, 1995.
3. BASIC theory of mass spectrometry. **Clin. Chim. Acta**, v. 241-242, p. 15-71, 1995.
4. THOMSON, B.A.; Atmospheric Pressure Ionization and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry – Together at Last. **J. Am. Soc. Mass Spectrom**, v. 9, p. 187-193, 1998
5. SHABIR, G. A.; Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **J.Chromatogr. A**, v.987, p.57-66, 2003.
6. COLOMBO, R. **Extração e análise cromatográfica (CLAE/UV e CLAE/EM) dos flavonóides da cana-de-açúcar (Saccharum officinarum)**. 2003. 166 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.
7. SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 5 ed. 1994, 460p.
8. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2.ed. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1997. 765p.
9. NIESSEN, W.M.A. Advances in instrumentation in liquid chromatography-mass spectrometry and related liquid-introduction techniques. **J. Chromatogr. A**, v.794, p.407-435, 1998.
10. NIESSEN, W.M.A. State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v.856, p.179-197, 1999.

11. CECH, N.B.; ENKE, C.G. Practical Implications of some Recent Studies in Electrospray Ionization Fundamentals. **Mass Spectr.**, v. 20, p. 362-387, 2001.
12. BRUINS, A.P. Mechanistic Aspects of Electrospray Ionization. **J.Chromatogr. A**, v.794, p.345-357, 1998.
13. WEINMANN, W.; WIEDEMANN, A.; EPPINGER, B.; RENZ, M. Screening for Drugs in Serum by Electrospray ionization/collision-induced Dissociation and Library Searching. **J. Am. Soc. Mass Spectrom**, v. 10, p. 1028-1037, 1999
14. MORAES, M.C.B.; LAGO, C.L. Espectrometria de Massas com Ionização por "Electrospray" Aplicada ao Estudo de Espécies Inorgânicas e Organometálicas. **Quím. Nova**, v. 26, n. 4, p. 556-563, 2003.
15. COLE, R.B.; ed. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, and applications. New York, Wiley-Interscience, 1997. 577p.
16. ZHOU, S.; COOK, K.D. A mechanistic study of Electrospray Mass Spectrometry: Charge Gradients within Electrospray Droplets and their Influence on ion Response. **J. Am. Soc. Mass Spectrom**, v. 12, p. 206-214, 2001.
17. TITATO, G.M. **Desenvolvimento de Metodologia para a Determinação de Pesticidas Selecionados em um Sistema de Cromatografia em Fase Líquida Acoplado à Espectrometria de Massas (HPLC-MS): Comparação entre ESI e APCI**. 2004. 166 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
18. SCRIPPS CENTER FOR MASS SPECTROMETRY. Introduction to Mass Spectrometry. Net, São Carlos, abril 2004. Disponível em: <<http://masspec.scripps.Edu/information/intro/chapter1.html>>. Acesso em: 15 novembro 2004.
19. CARERI, M.; BIANCHI, F.; CORRANDINI, C. Recent Advances in the Application of Mass Spectrometry in Food - Related Analysis. **J.Chromatogr. A**, v.970, n. 1-2, p.3-64, 2002.

CAPÍTULO 5

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA OS

FÁRMACOS ADTs E ACVs

*Tenho-vos dito isto, para que em
mim tenhais paz; no mundo tereis
aflições, mas tende bom ânimo,
eu venci o mundo. (Jo 16:33)*

5.1 - INTRODUÇÃO

5.1.1 - VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Validação é um processo que fornece uma evidência documentada de que o método é confiável ao que se aplica. Consiste em uma série de procedimentos que visam assegurar credibilidade às medidas obtidas, principalmente quando se trata da análise de compostos de interesse biomédico em matrizes biológicas ¹⁻⁹. No Brasil, na área de saúde, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é quem determina os parâmetros a serem estudados, bem como os limites de tolerância para um processo de validação de uma metodologia analítica. A ANVISA também determina que a validação de todos os métodos bioanalíticos envolvendo métodos cromatográficos de análise seja feita empregando o método do padrão interno ¹.

Segundo a ANVISA a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar linearidade, especificidade, precisão, limites de detecção e quantificação adequados para a análise ¹.

5.1.2 - GRÁFICO ANALÍTICO/ LINEARIDADE ¹⁻⁹

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. É avaliada por meio de um gráfico analítico em que se aplica a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A ANVISA recomenda que se construa um gráfico analítico para cada fármaco, utilizando-se a

mesma matriz biológica proposta para o estudo, devendo-se incluir a análise da amostra branco (matriz biológica isenta de padrão do fármaco e do padrão interno), da amostra zero (matriz biológica mais o padrão interno) e de cinco a oito amostras contendo padrão do fármaco e padrão interno, contemplando o limite de variação esperado (80% da concentração mais baixa e 120% da concentração mais alta que se pretende analisar), inclusive o LQ. Além disso, fatores como desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o LQ, desvio menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva analítica e coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98 devem ser considerados na avaliação do gráfico analítico.

5.1.3 - ESPECIFICIDADE/SELETIVIDADE ¹⁻⁹

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Para a especificidade, análises de amostras branco da matriz biológica devem ser obtidas de, pelo menos, seis fontes: 4 plasma normais, 1 plasma lipêmico e 1 plasma hemolizado.

5.1.4 - PRECISÃO ¹⁻⁹

A precisão reflete o grau de dispersão dos resultados quando o método é aplicado em várias amostras, sendo este, em um mesmo laboratório, com o mesmo modo de preparo da mostra e utilizando os mesmos equipamentos. Geralmente a precisão é expressa pelo desvio padrão relativo (DPR%) ou coeficiente de variação (CV%) dos resultados. Ainda, de acordo com a ANVISA, a precisão do método é verificada através de, no mínimo, três concentrações (baixa, média e alta),

contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se, no mínimo, cinco determinações por concentração. A precisão deve ser determinada em um mesmo dia (precisão intra-dia) e em dias diferentes (precisão inter-dias); Tanto a precisão intra-dia como a inter-dias não deve exceder 15%, exceto no limite de quantificação, a qual não deve ultrapassar 20%.

5.1.5 - LIMITE DE DETECÇÃO¹⁻⁹

É a menor concentração do analito que pode ser detectada com segurança. Este limite pode ser determinado com base em avaliação visual, relação sinal/ruído ou no desvio padrão e coeficiente angular da curva analítica. Pela regulamentação da ANVISA recomenda-se que o LD seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base. A região adotada para a obtenção do ruído é de 20 vezes a largura do pico na meia altura, sendo 10 vezes antes e 10 vezes após o máximo do sinal analítico.

5.1.6 - LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO¹⁻⁹

É a menor concentração do analito que pode ser quantificada com segurança. De acordo com a ANVISA, nenhuma interferência significativa deve ser apresentada pela amostra branco no tempo de retenção do fármaco. O LQ deve ser no mínimo cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branco no tempo de retenção do fármaco; além disso, o pico de resposta do fármaco no LQ deve ser identificável e reprodutível com precisão de 20%.

5.1.7 - RECUPERAÇÃO ¹⁻⁹

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação próximas a 100% são desejáveis, porém, admitem-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata. A recuperação pode ser definida de duas formas:

- ❖ Recuperação absoluta: É uma relação entre a resposta do analito extraído da matriz fortificada e a resposta do padrão analítico puro que não tenha sido submetido ao processo de extração. A resposta gerada pelo padrão não extraído representa uma recuperação de 100%.
- ❖ Recuperação relativa: Quando se utiliza um padrão interno, a recuperação é medida como uma relação entre as respostas dos analitos e a do padrão interno extraídos de uma matriz fortificada e as respostas dos analitos e do padrão interno quando não submetidos ao processo de extração.

5.2 - PARTE EXPERIMENTAL

5.2.1- ACOPLAMENTOS SPME-LC/MS E SPME-LC

Em ambos os acoplamentos para a SPME foram utilizados o recobrimento PDMS/DVB (60 µm) utilizando a interface “*labmade*” com aquecimento. A descrição do equipamento e o procedimento analítico utilizados para os experimentos com os ADTs estão descritos nas **seções 3.43, 3.4.5, 4.2.2 e 4.2.3**. Para os ACVs foram utilizados os descritos nas **seções 3.4.9 e 3.4.11**.

5.2.2 - ESPECIFICIDADE/SELETIVIDADE

Para verificar este item, foram realizadas extrações usando diferentes amostras de plasma branco. Foram verificadas 4 amostras diferentes de plasma normal e uma amostra de plasma hemolizado.

5.2.3 - PREPARAÇÃO DO GRÁFICO ANALÍTICO PARA OS ADTs

Para obtenção da resposta (áreas dos picos dos ADTs), em termos das concentrações conhecidas dos fármacos, foram construídos dois gráficos analíticos: um gráfico analítico dos fármacos e um gráfico analítico com a extração do plasma fortificado com os ADTs.

Para obtenção do gráfico analítico dos fármacos, foi realizada a injeção no LC/MS em diferentes concentrações pela simples diluição dos padrões a partir das soluções estoques (amostras sem a presença da matriz biológica (plasma) e não submetidas ao processo de extração).

Para obtenção do gráfico analítico extraído, preparou-se 8 amostras sendo: uma amostra branco (isenta dos ADTs e do padrão interno), uma amostra zero (contendo somente o padrão interno) e 6 amostras com a presença da matriz biológica com diferentes concentrações dos padrões ADTs e do padrão interno (1000 ng mL⁻¹). As amostras referentes aos pontos constituintes do gráfico, foram extraídas em duplicata no caso das concentrações de 100, 250 e 350 ng mL⁻¹, e em triplicata para os ponto 50, 150 e 500 ng mL⁻¹. A **Tabela 5.1** ilustra o preparo do gráfico analítico.

Tabela 5.1 - Preparação do gráfico analítico para os ADTs.

Amostra	Solução de trabalho dos ADTs (mg L ⁻¹)	Volume adicionado ADTs (μL)	Concentração CLOMI (ng mL ⁻¹)	Concentração final dos ADTs (ng mL ⁻¹)
Branco	-	-	-	0
Zero	-	-	1000	0
1	1	50	1000	50
2	1	100	1000	100
3	1	150	1000	150
4	1	250	1000	250
5	1	350	1000	300
6	1	500	1000	500

5.2.4 - PREPARAÇÃO DO GRÁFICO ANALÍTICO PARA OS ACVs

Para obtenção do gráfico analítico, preparou-se 8 amostras sendo: uma amostra branco (isenta dos ACVs e do padrão interno), uma amostra zero (contendo somente o padrão interno) e 6 amostras com a presença da matriz biológica com diferentes concentrações dos padrões ACVs e do padrão interno (30 mg L^{-1}). As amostras referentes aos pontos constituintes do gráfico, foram extraídas em duplicata no caso das concentrações de 3,25, 11,25 e $15,00 \text{ mg L}^{-1}$ (epóxido-carbamazepina e carbamazepina); 10, 30 e 40 mg L^{-1} (fenobarbital e fenitoína) e em triplicata para os pontos 1,50, 7,25, $18,75 \text{ mg L}^{-1}$ (epóxido-carbamazepina e carbamazepina); 4, 20 e 50 mg L^{-1} (fenobarbital e fenitoína).

Tabela 5.2 - Preparação do gráfico analítico para os fármacos epóxido-carbamazepina e carbamazepina.

Amostra	Solução de trabalho para ACVs (mg L^{-1})	Volume adicionado dos ACVs (μL)	Concentração hidantoína (mg L^{-1})	Concentração final dos ACVs (mg L^{-1})
Branco	-	-	-	0
Zero	-	-	30,00	0
1	75,00	20,00	30,00	1,50
2	75,00	43,30	30,00	3,25
3	375,00	19,30	30,00	7,25
4	375,00	30,00	30,00	11,25
5	375,00	40,00	30,00	15,00
6	375,00	50,00	30,00	18,75

Tabela 5.3 - Preparação do gráfico analítico para os fármacos fenitoína e fenobarbital.

Amostra	Solução de trabalho para ACVs (mg L ⁻¹)	Volume adicionado dos ACVs (μL)	Concentração hidantoína (mg L ⁻¹)	Concentração final dos ACVs (mg L ⁻¹)
Branco	-	-	-	0
Zero	-	-	30	0
1	200	20	30	4
2	200	50	30	10
3	1000	20	30	20
4	1000	30	30	30
5	1000	40	30	40
6	1000	50	30	50

5.2.5 - PRECISÃO

Para avaliar a precisão do método, foram feitos 9 experimentos contemplando o intervalo linear do método em quintuplicata nas concentrações baixa, média e alta do gráfico analítico.

5.2.6 - LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) E DE DETECÇÃO (LD)

O limite de quantificação foi estabelecido de acordo com a faixa terapêutica de cada compostos. O limite de detecção foi obtido pela injeção da mistura dos padrões no sistema LC para os ACVs e LC/MS para o ADTs.

5.2.7 RECUPERAÇÃO

Os valores de recuperação em SPME para os fármacos ADTs e ACVs em plasma foram comparados com valores equivalentes na mesma concentração destes fármacos em metanol por injeções direta nos sistemas LC/MS e LC respectivamente.

5.3. - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 - VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA OS ADTS

Os parâmetros de validação do método de análise para os ADTs em plasma humano foram condicionados a Resolução – Re nº 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que estabelece as normas para aprovação das metodologias analíticas.

5.3.2 - LINEARIDADE

Os valores obtidos com os gráficos analíticos de cada fármaco para os coeficientes de correlação (r^2) e equações da reta no intervalo de concentração de 50 a 500 ng mL⁻¹ utilizando o acoplamento SPME-LC/MS estão apresentados na **Tabela 5.3**. Os coeficientes de correlação, obtidos pelo método dos mínimos quadrados, para verificação linearidade do instrumento foram maiores que 0,999, ou seja, o instrumento apresenta linearidade na faixa de concentração ao qual será construído o gráfico analítico obtido utilizando a SPME que inclui o intervalo de concentração plasmática terapêutica dos ADTs.

A linearidade do método foi determinada usando plasma fortificado com os ADTs. Os valores obtidos com os gráficos analíticos para os ADTs utilizando a SPME com a fibra PDMS/DVB (60 μm) para os coeficientes de correlação e equações da reta no intervalo de concentração de 50 a 500 ng mL^{-1} estão apresentados na **Tabela 5.4**. Os coeficientes de correlação obtidos apresentaram resultados maiores que 0,985. Estes valores estão dentro critérios admitidos pela ANVISA que estabelece como aceitável coeficiente de correlação igual ou superior a 0,980 para métodos bioanalíticos.

Tabela 5.3 – Valores obtidos para as equações da reta e coeficientes de correlação para os gráficos analíticos dos fármacos ADTs.

Gráfico analítico	Equação da reta	Coeficientes de correlação (r^2)
DESI	$Y = -3659 + 499030x$	0,999
NOR	$Y = +7525 + 725003x$	0,999
IMI	$Y = -1391 + 303621x$	0,999
AMI	$Y = -4265 + 545870x$	0,999

Tabela 5.4 – Valores obtidos para as equações da reta e coeficientes de correlação para os gráficos analíticos obtidos com a SPME-LC/MS para os ADTs.

Gráfico analítico	Equação da reta	Coeficientes de correlação (r^2)
DESI	$Y = -0,06856 + 0,00197 X$	0,993
NOR	$Y = -0,02020 + 0,00184 X$	0,991
IMI	$Y = -0,02673 + 0,00199 X$	0,985
AMI	$Y = -0,03996 + 0,00214 X$	0,986

5.3.3 - PRECISÃO

Os valores obtidos tanto para a precisão intra-dia como para inter-dias foram expressos em termos de desvio padrão relativo (% DPR). Em ambos os casos a % DPR obtida foi menor que 20% em todas as concentrações avaliadas (50, 150 e 500 ng mL⁻¹), como apresentados nas **Tabelas 5.5 e 5.6**.

Tabela 5.5 – Valores da concentração e % DPR na avaliação da precisão intra-dia para a DESI, NOR, IMI e AMI.

Concentração (ng mL ⁻¹)	DESI intra-dia % DPR	NOR intra-dia % DPR	IMI intra-dia % DPR	AMI intra- dia % DPR
50,00	6,17	3,76	17,35	14,92
100,00	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
150,00	10,94	8,29	9,00	11,00
250,00	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
350,00	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
500,00	1,08	3,00	2,51	3,32

*n.a.: não avaliado

Tabela 5.6 – Valores da concentração e % DPR na avaliação da precisão entre-dias para a DESI, NOR, IMI e AMI.

Concentração (ng mL ⁻¹)	DESI entre- dias % DPR	NOR entre- dias % DPR	IMI entre-dias % DPR	AMI entre- dias % DPR
50,00	9,46	8,50	15,05	15,49
100,00	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
150,00	10,45	9,14	8,23	7,84
250,00	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
350,00	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
500,00	8,48	9,81	7,80	4,63

*n.a.: não avaliado

5.3.4 - RECUPERAÇÃO

Os valores de recuperação obtidos após a SPME (**Tabela 5.7**) variaram de 1,21 a 7,67 %. Quando comparado com outras técnicas de extração estes valores de recuperação podem ser considerados baixos. Contudo, estes valores são comuns em SPME, a qual que é uma técnica em micro-escala e não emprega extração exaustiva.

Tabela 5.7 - Valores obtidos para a recuperação em SPME.

Concentração (ng mL ⁻¹)	Recuperação (%) DESI	Recuperação (%) NOR	Recuperação (%) IMI	Recuperação (%) AMI
50,00	1,34	3,42	3,22	2,15
150,00	6,23	5,79	7,67	6,70
500,00	2,72	2,37	1,92	1,21

5.3.5 - LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) E DE DETECÇÃO (LD)

O limite de quantificação (LQ) foi estabelecido em um nível de 50,0 ng mL⁻¹ onde após três extrações nesta concentração o RSD obtido foi menor que 20%. O limite de detecção (LD) para os ADTs foi estabelecido como sendo a concentração onde o pico dos fármacos foi duas vezes superior ao ruído da linha de base, sendo de 0,1 ng mL⁻¹ para o método desenvolvido.

A **Figura 5.1** ilustra um cromatograma típico referente ao acoplamento SPME-LC/Ms para os antidepressivos tricíclicos.

Figura 5.1 - Cromatograma do íon total obtido com o acoplamento SPME-LC/MS, no modo de ionização positivo para os ADTs na concentração de 50 ng mL^{-1} . (1) desipramina, (2) nortriptilina, (3) imipramina, (4) amitriptilina e (5) clomipramina (PI).

5.3.6 - CONCLUSÕES

A SPME mostrou ser uma técnica adequada para a extração dos fármacos antidepressivos tricíclicos, com a vantagem de usar uma quantidade pequena de solvente. A interface desenvolvida no laboratório permitiu uma boa performance para o acoplamento SPME-LC/MS. O método desenvolvido mostrou especificidade, precisão, linearidade e limite de quantificação adequado para análise dos fármacos antidepressivos tricíclicos.

5.4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1 - VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA OS ACVS

Os parâmetros de validação do método de análise para os ACVs em plasma humano foram condicionados a Resolução – Re nº 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que estabelece as normas para aprovação das metodologias analíticas.

5.4.2 - ESPECIFICIDADE

Nenhum pico significativo de interferente foi eluído no mesmo tempo de retenção dos compostos empregados como pode ser observado na **Figura 5.2**, apresentando assim o método uma especificidade adequada.

Figura 5.2 – Cromatogramas obtidos com a SPME (PDMS/DVB 60 μm) para a amostras de plasma branco normais, plasma hemolizado e amostra de plasma fortificada com ACVs na concentração de 5 mg L^{-1} .

5.4.3 - LINEARIDADE

Os valores obtidos com os gráficos analíticos de cada fármaco para os coeficientes de correlação (r^2), obtidos pelo método dos mínimos quadrados, e equações da reta no intervalo de concentração de 1,50 a 50,00 mg L⁻¹. A linearidade do método foi determinada usando plasma fortificado com os ACVs. Os valores obtidos com os gráficos analíticos para os ACVs utilizando a SPME-LC com a fibra PDMS/DVB (60 µm) para os coeficientes de correlação e equações da reta no intervalo de concentração de 1,50 a 50,00 mg L⁻¹ estão apresentados na **Tabela 5.8**. Os coeficientes de correlação obtidos apresentaram resultados maiores que 0,997. Estes valores estão dentro critérios admitidos pela ANVISA que estabelece como aceitável coeficiente de correlação igual ou superior a 0,98 para métodos bioanalíticos.

Tabela 5.8 – Valores obtidos para as equações da reta e coeficientes de correlação para os gráficos analíticos obtidos com a SPME-LC para os ACVs.

Gráfico analítico	Equação da reta	Coeficientes de correlação (r^2)
Fenobarbital	$Y = -0,014 + 0,130 X$	0,997
epóxido-cabamazapina	$Y = 0,003 + 0,910 X$	0,997
Fenitoína	$Y = -0,028 + 0,415 X$	0,998
Carbamazepina	$Y = 0,021 + 2,209 X$	0,992

5.4.4 - PRECISÃO

Os valores obtidos para a precisão intra-dia foram expressos em termos de desvio padrão relativo (%DPR). A % DPR obtida nas concentrações avaliadas foi menor que 20% para o limite de quantificação e menor que 15% nas demais concentrações como apresentados nas **Tabelas 5.9 e 5.10**.

Tabela 5.9 – Valores da concentração e % DPR na avaliação da precisão intra-dia para os fármacos fenobarbital e fenitoína.

Concentração (mg L ⁻¹)	PB intra-dia % DPR	FT intra-dia % DPR
1,50	18,04	18,28
3,25	6,38	6,17
7,25	5,79	5,82
11,25	5,43	9,25
15,00	8,49	11,81
18,75	9,07	9,69

Tabela 5.10 – Valores da concentração e % DPR na avaliação da precisão intra-dia para os fármacos epoxido-carbamazepina e carbamazepina.

Concentração (mg L ⁻¹)	CBZ-E intra-dia % DPR	CBZ intra-dia % DPR
4,00	16,03	11,44
10,00	9,65	6,95
20,00	11,52	5,51
30,00	13,26	7,38
40,00	0,72	1,45
50,00	3,54	3,95

5.4.5 - RECUPERAÇÃO

Os valores de recuperação dos ACVs em plasma (**Tabela 5.11**) foram comparados com valores equivalentes na mesma concentração destes fármacos em metanol pela injeção direta em LC. Os valores de recuperação obtidos após a SPME variaram de 0,04 a 0,71 %. Quando comparado com outras técnicas de extração estes valores de recuperação podem ser considerados baixos. Contudo, estes valores são comuns em SPME, a qual que é uma técnica em micro-escala e não emprega extração exaustiva.

Tabela 5.11 - Valores obtidos para a recuperação em SPME para os fármacos CBZ-E e CBZ.

Concentração (mg L ⁻¹)	Recuperação (%) CBZ-E	Recuperação (%) CBZ
1,50	0,19	0,46
3,25	n.a.	n.a.
7,25	0,29	0,58
11,25	n.a.	n.a.
15,00	n.a.	n.a.
18,75	0,35	0,71

n.a.= não avaliado

Tabela 5.12 - Valores obtidos para a recuperação em SPME para os fármacos PB e FT.

Concentração (mg L ⁻¹)	Recuperação (%) PB	Recuperação (%) FT
4,00	0,04	0,14
10,00	n.a.	n.a.
20,00	0,11	0,32
30,00	n.a.	n.a.
40,00	n.a.	n.a.
50,00	0,16	0,41

n.a.= não avaliado

5.4.6 - LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) E DETECÇÃO (LD)

O limite de quantificação (LQ) foi estabelecido em um nível de 1,5 mg L⁻¹ para CBZ e CBZ-E e 4,0 mg L⁻¹ para FT e PB onde após três extrações nesta concentração o RSD obtido foi menor que 20%. O limite de detecção (LD) para os ACVs foi estabelecido como sendo a concentração onde o pico dos fármacos foi três vezes superior ao ruído da linha de base, sendo de 0,040 mg L⁻¹ para fenobarbital e fenitoína, 0,030 mg L⁻¹ para epóxido-carbamazepina e 0,015 mg L⁻¹ para carbamazepina. A **Figura 5.3** ilustra um cromatograma típico referente ao acoplamento SPME-LC para os ACVs.

Figura 5.3 - Cromatograma típico obtido com o acoplamento SPME-LC para os ACVs na concentração de 18,75 e 50,00 mg L⁻¹. (1) fenobarbital, (2) epóxido-carbamazepina, (3) fenitoína, (4) carbamazepina e (5) hidantoína (PI).

5.4.7 - CONCLUSÕES

A SPME mostrou ser uma técnica adequada para a extração dos fármacos anticonvulsivantes, com a vantagem de usar uma quantidade pequena de solvente. A interface desenvolvida no laboratório permitiu uma boa performance para o acoplamento SPME-LC. O método desenvolvido mostrou especificidade, precisão, linearidade e limite de quantificação adequado para análise dos fármacos anticonvulsivantes.

5.5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em 23/08/2005.
2. CAUSON, R. Validation of chromatography methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. **J. Chromatogr. B**, v.689, n.1, p.175-180, 1997.
3. CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH (CDER). Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic methods. Rockville, FDA, 2000. 1v. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance/cmc3.pdf>. Acesso em 28/10/2005.
4. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. ICH Harmonised Tripartite Guideline. **Validation of analytical procedures methodology Q2B**. Geneva, ICH, 1996. Disponível em : <http://www.ich.org/MediaServer.jserv?@_ID+418&@_MODE=GLB>. Acesso em: 28/10/2005.
5. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Text on Validation of Analytical Procedures Methodology Q2A. Geneva, ICH, 1994. Disponível em: <http://www.ich.org/MediaServer.jserv?@_ID+417&@_MODE=GLB>. Acesso em: 28/10/2005.
6. FRANCOIS, E.; DAVATZ, A.; RICHERT, P. Development and validation of chiral high-performance liquid chromatographic methods for the quantitation of valsartan and of the tosylate of valinebenzyl ester. **J. Chromatogr. B**, v.686, n.1, p.77-83, 1996.
7. SHABIR, G. A.; Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **J. Chromatogr. A**, v.987, p.57-66, 2003.
8. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2.ed. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1997. 765p.

9. LEITE, F. **Validação em análise química.** Campinas, Editora Átomo LTDA, 1996. 124p.

10. F. M. LANÇAS, **Validação de métodos Cromatográficos de análise.** São Carlos, Rima, 2004. 62p.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES GERAIS

**Todas as coisas vêm única e exclusivamente de Deus. Tudo
vive por seu poder, e tudo é para sua glória.
A Ele seja a glória para todo o sempre. (Rom.11:36)**

6 - CONCLUSÕES GERAIS

Os métodos convencionais empregados no tratamento de amostras biológicas, para análises fármacos por técnicas cromatográficas, têm sido a extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE). Estas técnicas apresentam algumas desvantagens, tais como: utilização de solventes orgânicos de alta pureza, exposição do analista a compostos tóxicos, várias etapas para sua execução, formação de emulsão entre as fases (LLE) e bloqueio dos poros da fase extratora pelos componentes da matriz (SPE). No entanto, nos últimos anos, com o avanço das técnicas instrumentais, diversos métodos têm sido avaliados para a análise de diferentes fármacos em fluidos biológicos, destacando-se entre elas a Microextração em Fase Sólida (SPME).

A SPME apresenta uma série de vantagens em relação às técnicas de extração convencionais, ou seja: não requer instrumentação analítica sofisticada, utiliza uma pequena quantidade de solvente orgânico, no caso do acoplamento com a LC, a reutilização das fibras extratoras e integra em um único sistema, a extração, concentração e introdução da amostra no sistema cromatográfico, mostrando assim ser uma técnica adequada para a extração dos fármacos ADTs e ACVs.

A interface desenvolvida no laboratório permitiu uma boa performance para o acoplamento SPME-LC e SPME-LC/MS. Ela melhorou a dessorção dos analitos quando comparada ao processo *off-line* em duas maneiras distintas. Primeiro, porque a quantidade total dos analitos dessorvidos é injetada, diferente do processo *off-line*, onde somente parte da solução é analisada. Segundo, a interface tem uma câmara de aquecimento que aumenta a transferência de massa do analito da fibra para a fase móvel aquecida.

Uma abordagem quimiométrica na elaboração dos experimentos foi empregada, através da utilização de planejamento fatorial, a qual mostrou-se uma ferramenta estatística importante e simples, sendo obtidas mais informações com um número menor de experimentos, avaliando não só os efeitos principais como os efeitos de interação de todas as variáveis nas respostas.

As condições cromatográficas otimizadas foram adequadas para a análise por LC/MS. Os níveis de detecção alcançados ressaltam a importância e destaque da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC/MS).

O método desenvolvido, tanto para os fármacos antidepressivos tricíclicos como para os anticonvulsivantes, mostrou especificidade, precisão, linearidade e limite de quantificação adequado para a análise.