

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ANTÔNIO FELIPE FELICIONI OLIVEIRA

**ANÁLISE DE FLUOXETINA E
NORFLUOXETINA EM PLASMA POR
MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA E
GC-MS COM DERIVATIZAÇÃO NO INJETOR**

Alfenas/MG

2011

ANTÔNIO FELIPE FELICIONI OLIVEIRA

**ANÁLISE DE FLUOXETINA E
NORFLUOXETINA EM PLASMA POR
MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA E
GC-MS COM DERIVATIZAÇÃO NO INJETOR**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Desenvolvimento e avaliação microbiológica e físico-química de fármacos, toxicantes e medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto

Alfenas/MG

2011

Oliveira, Antônio Felipe Felicioni.

Análise de fluoxetina e norfluoxetina em plasma por
microextração em fase líquida e GC-MS com derivatização no
injetor . / Antônio Felipe Felicioni Oliveira . - 2011.

72 f. -

Orientador: Álvaro José dos Santos Neto.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2011.

1. Fluoxetina. 2. Derivatização. 3. Cromatografia de gás. 4.
Espectrometria de massa. I. Santos Neto, Álvaro José dos. II.
Título.

CDD: 615.9

ANTÔNIO FELIPE FELICIONI OLIVEIRA

**ANÁLISE DE FLUOXETINA E
NORFLUOXETINA EM PLASMA POR
MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA E
GC-MS COM DERIVATIZAÇÃO NO INJETOR**

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Desenvolvimento e avaliação microbiológica e físico-química de fármacos, toxicantes e medicamentos.

Aprovada em: ___/___/_____

Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto Assinatura: _____

Instituição: Universidade de São Paulo – USP São Carlos

Prof. Dr. Maurício Yonamine Assinatura: _____

Instituição: Universidade de São Paulo – USP São Paulo

Prof. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Assinatura: _____

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – Unifal - MG

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Dimas e Rita,

Fontes de toda a inspiração para a conquista deste título.

Obrigado por reconhecer em mim tanto de vocês,
pelo amor, ensinamentos e belos exemplos sempre presentes durante essa e todas as outras
etapas da minha vida.

À Renata,

Amada companheira, namorada e amiga.

Por seu amor, carinho e respeito presentes em cada e

em todos os momentos dessa etapa,

E por sua confiança fundamental para essa conquista.

Te amo!

À Olivia,

Amiga incondicional e parceira desde sempre,

Pela amizade atenção e incentivo.

À toda minha família

Raiz profunda e segura na qual sustento meu ser.

Obrigado, a cada um de vocês pela atenção, carinho e conselhos dispensados.

AGRADECIMENTOS

À professora Doutora Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira, guru do meu e de muitos outros caminhos pela pesquisa. Pela amizade, confiança e ensinamentos, os quais levarei comigo por toda minha vida. Obrigado Professora.

Ao Professor Doutor Álvaro José dos Santos Neto, exemplo de dedicação e competência como professor e pesquisador, pela amizade e orientação. Com admiração e certeza do sucesso em sua trajetória acadêmica.

Ao Professor Doutor Eduardo Costa de Figueiredo, co-orientador e colaborador assíduo neste trabalho, pela paciência, atenção e tempo dispensados bem como pela amizade e confiança.

A toda “família” do Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos – LATF, pela qual eu tenho orgulho de dizer que fui criado durante esses cinco anos. Obrigado Isarita, Patrícia, Beth, Vanessa, Diogo, Márcia e Andressa por serem além de companheiros de trabalho, verdadeiros amigos.

Aos amigos e companheiros de laboratório que durante a iniciação científica e o mestrado contribuíram com meu trabalho e compartilharam dificuldades, resultados e experiências.

Aos amigos e colegas de mestrado André, Gabriel, Olímpia, Patrícia, Isabela, Mariane e Lara que contribuíram de forma decisiva para a realização desse trabalho.

Ao auxílio técnico da acadêmica Thrcia Resende durante o desenvolvimento dos trabalhos laboratoriais dessa dissertação.

Aos secretários do PPGCF, Thiago e Fabiana pela atenção e por serem sempre solícitos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unifal-MG pela oportunidade de aprendizado e formação durante a graduação, pós graduação e mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho. Muito obrigado!!!

*Nada é mais real que aprender maneira simples de viver.
Tudo é tão normal se a gente não se cansa nunca de aprender
Sempre olhar como se fosse a primeira vez...
Se espantar como criança a perguntar por quês?*

Almir Sater

RESUMO

A fluoxetina (FLU) é um antidepressivo amplamente prescrito para depressão e outras doenças neurológicas. Além da forma inalterada, seu metabólito, a norfluoxetina (NOR), também possui atividade farmacológica. A determinação de FLU em fluidos biológicos é necessária para fins de monitorização terapêutica (TDM), no desenvolvimento de novas formulações, bem como em análises toxicológicas e forenses. Técnicas miniaturizadas, como a microextração em fase líquida (LPME), vêm sendo utilizadas no preparo de amostras biológicas, sendo simples, sensíveis e ambientalmente adequadas. A cromatografia líquida é considerada a técnica de escolha para a análise de FLU e NOR, porque em sua forma não derivatizada esses compostos são incompatíveis com a cromatografia gasosa (GC), a qual seria de interesse por sua simplicidade e baixo custo. Este trabalho apresenta o desenvolvimento de um método para a análise de FLU e NOR em plasma por LPME-GC-MS utilizando derivatização no injetor (IPD). Após derivatizados, os fármacos se tornam adequados à análise, sendo o processo *online* promissor devido ao baixo consumo de agente derivatizante e não adição de etapas no preparo de amostras. Foram utilizadas fibras ocas de polipropileno (600 µm de diâmetro interno, 200 µm de espessura da parede, e 0,2 µm de tamanho dos poros) para a extração por LPME, as análises foram feitas em um GC-MS 2010 Plus Shimadzu®. Um microlitro de agente derivatizante, MBTFA (n-metil-bis trifluoroacetamida) e 2 µL de extrato foram injetados diretamente no injetor do GC. O processo de derivatização *online* foi otimizado quanto à vazão do gás de arraste, temperatura do injetor e da coluna, injeção sob alta pressão (HPI), e tipo de *liner*. O processo de extração foi avaliado quanto ao efeito de *salting out*, pH da fase doadora e precipitação de proteínas plasmáticas. Além desses, os parâmetros termodinâmicos (tipo de solvente, volume e concentração do tampão e diluição da amostra), e cinéticos (tempo de extração e velocidade de agitação) foram otimizados. Para a derivatização *online* foram otimizadas vazão de 1,7 mL/min, injetor a 300 °C e temperatura inicial da coluna de 140 °C, utilizando o modo HPI a 250 kPa e *liner split*. Utilizando as condições cromatográficas otimizadas e nortriptilina como padrão interno o método proposto foi: 1 mL de plasma após a precipitação de proteínas com solução de ZnSO₄/NaOH, 4 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L pH 11, fibra oca de 3,7 cm com 10 µL de éter dihexílico extraído por 30 min a 700 rpm. O método mostrou-se linear para FLU entre 10 e 500 ng/mL ($R^2 = 0,9973$), e para NOR entre 15 e 500 ng/mL ($R^2 = 0,9972$). Os limites de detecção e quantificação foram de 3 e 10 ng/mL, e de 5 e 15 ng/mL para a FLU e NOR, respectivamente. A precisão e exatidão foram avaliadas para 3 concentrações dos analitos (50, 250 e 500 ng/mL). Seletividade, estabilidade de curta duração e recuperação também foram avaliadas. O método foi aplicado com sucesso na análise de plasma de 5 pacientes em tratamento com FLU. O método desenvolvido é rápido, sensível e ambientalmente adequado, reduzindo significativamente o uso de solventes tanto no preparo de amostras quanto no processo de separação. A derivatização *online* com MBTFA, inédita até o momento para a análise de fármacos por GC, mostrou resultados promissores podendo ser utilizada como uma alternativa a análises por HPLC.

Palavras-chave: fluoxetina, norfluoxetina, LPME, GC-MS, MBTFA, derivatização no injetor.

ABSTRACT

Fluoxetine (FLU) is a widely prescribed antidepressant for major depression and other neurological diseases. In addition to the unchanged form, its metabolite – norfluoxetine (NOR) – also has pharmacological activity. Determination of FLU in biofluids is necessary in therapeutic drug monitoring (TDM), in new formulation development, as well as in analytical and forensic toxicology. Miniaturized techniques such as LPME have been used in biological sample preparation, being simple, sensitive, and environmentally friendly. Liquid chromatography is considered the technique of choice for the analysis of FLU and NOR, because in its underivatized form these compounds are incompatible with gas chromatography (GC); which would be of interest for its simplicity and low cost. This work presents the development of a method for FLU and NOR analysis in plasma by LPME-GC-MS using injection-port derivatization (IPD). The process made these drugs suitable for analysis, being the online procedure promising due to low derivatizing agent consumption, as well as not adding steps in sample preparation. Polypropylene hollow-fibers (600 μm inside diameter, 200 μm wall thickness, and 0.2 μm pore size) were used for extraction and analyses were performed in a GC-MS 2010 Plus Shimadzu[®]. One microliter of derivatizing agent MBTFA (n-methyl-bis trifluoroacetamide) and 2 μL of extract were directly injected into the GC port. The IPD process was optimized for carrier gas flow rate, injector and column temperature, high-pressure injection mode (HPI), and type of insert liner. The extraction was evaluated for salting out effect, donor phase pH, and plasma proteins precipitation; additionally, two factorial designs were performed to verify the influence of thermodynamic parameters (type and volume of solvent, buffer concentration and dilution of the sample), and of kinetic parameters (extraction time and stirring speed) on extraction. For the IPD were optimized a flow rate of 1.7 mL/min, an injector temperature of 300 °C and a column initial temperature of 140 °C, using HPI at 250 kPa and split liner. Using the optimized chromatographic conditions and nortriptyline as the internal standard the proposed method was: 1 mL of plasma after protein precipitation with $\text{ZnSO}_4/\text{NaOH}$, 4 mL of 0.1 mol/L phosphate buffer at pH 11. Hollow-fiber pieces of 3.7 cm with 10 μL of dihexyl ether for 30 min at 700 rpm were used for extraction. Linearity for FLU was between 10 and 500 ng/mL ($R^2 = 0.9973$), and for NOR between 15 and 500 ng/mL ($R^2 = 0.9972$). Detection and quantification limits of 3 and 10 ng/mL, and of 5 and 15 ng/mL for FLU and NOR, respectively. The intra-assay and inter-assay precision and accuracy were studied for three concentrations (50, 250 e 500 ng/mL). Selectivity, short term stability and extraction efficiency were also evaluated. After validated the method was successfully applied to the analysis of samples from 5 patients under fluoxetine treatment. The developed method is fast, sensible and environmentally friendly, significantly reducing both the use of solvents in sample preparation and separation. The IPD with MBTFA, unpublished until the moment for the GC analysis of drugs, has been showing promising results and may be used as an alternative to HPLC analysis.

Keywords: fluoxetine, norfluoxetine, LPME, GC-MS, MBTFA, Injection port derivatization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina	18
Figura 2 - Metabolismo de fluoxetina ressaltando a catálise pela isoenzima CYP2D6 em reações de fase I	20
Figura 3 - Estereoisômeros da fluoxetina e norfluoxetina.....	21
Figura 4 - Microextração em gota suspensa SDME.....	22
Figura 5 - Princípio básico da extração por LPME.....	23
Figura 6 - Micrografia eletrônica de secção da fibra de polipropileno.....	25
Figura 7 - Fotografia por microscopia eletrônica de varredura da fibra oca de PVDF....	25
Figura 8 - Configuração da fibra oca em formato de “U”	26
Figura 9 - LPME baseada na configuração <i>rod-like</i>	27
Figura 10 – Configuração para semi-automação	27
Figura 11 - LPME em configuração dinâmica	28
Figura 12 - Aparato de extração por LPME para agitação simultânea	29
Figura 13 – Mecanismo de <i>on column derivatization</i> com injetor de duas etapas e MBTFA.....	35
Figura 14 – Reação de acilação de FLU com MBTFA	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros farmacocinéticos de antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina	18
Tabela 2 – Aplicações da técnica LPME-GC na análise de fármacos	37

LISTA DE ABREVIATURAS

ATC – Antidepressivos tricíclicos

FLU – Fluoxetina

GC – Cromatografia gasosa

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

HF-LPME – *Hollow fiber liquid phase microextraction* (microextração em fase líquida em fibra oca)

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

HPI – *High pressure injection* (injeção sob alta pressão)

IMAO – Inibidores da monoamina oxidase

ISRS – Inibidores seletivos da recaptção de serotonina

IPD – *Injection port derivatization* (derivatização no injetor)

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

LLE – Extração em fase líquida

MBTFA – *n*-metil bis trifluoroacetamida

MMLLE - *Microporous membrane liquid-liquid extraction* (extração liquid-líquido em membrana microporosa)

NOR – Norfluoxetina

NTL – Nortriptilina

SBSE – *Stir bar sorptive extraction* (extração por sorção em barras de agitação)

SDME – *Single drop microextraction* (microextração em gota suspensa)

SLM - *supported liquid membrane* (membrana líquida em suporte)

SPE – *Solid phase extraction* (extração em fase sólida)

SPME – *Solid phase microextraction* (microextração em fase sólida)

PP - Polipropileno

PVDF – Polivilideno difluorado

Vd – Volume de distribuição

Sumário

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS)	20
2.2 Microextração em fase líquida (LPME)	25
2.2.1 Sistema extrator em duas fases	27
2.2.2 Sistema extrator em três fases	28
2.2.3 Composição e configuração do dispositivo de LPME	28
2.2.4 Otimização da técnica de HF-LPME	33
2.2.4.1 <i>Solvente orgânico</i>	33
2.2.4.2 <i>Tempo de extração</i>	33
2.2.4.3 <i>Temperatura de extração</i>	34
2.2.4.4 <i>Agitação da amostra</i>	34
2.2.4.5 <i>pH da fase doadora</i>	35
2.2.4.6 <i>Aditivos na fase doadora</i>	35
2.3 Análises de fármacos por GC	36
2.3.1 Derivatização química	36
2.3.2 Análise de fármacos por LPME-GC	40
2.4 Otimização de métodos analíticos por estratégia multivariada	41
2.4.1 Planejamentos fatoriais de dois níveis	42
2.4.2 Metodologia de superfícies de resposta	42
3 OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos	43
4 RESULTADOS	44
4.1 Artigo	44
REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

A análise de fármacos em material biológico é de grande interesse em várias áreas de aplicação, como em estudos de farmacocinética, monitorização terapêutica no uso prolongado de medicamentos, análises forenses e estudos de bioequivalência farmacêutica no desenvolvimento de medicamentos genéricos. Esse tipo de análise compreende as etapas de extração do analito, separação de interferentes e detecção, por meio das quais informações podem ser obtidas a respeito da quantidade e identidade do fármaco.

Dentre os fármacos para os quais é importante a determinação de concentrações plasmáticas estão os antidepressivos. Essas determinações são solicitadas seja com a finalidade de monitorização terapêutica seja para o diagnóstico de intoxicações. Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) vêm substituindo os bem estabelecidos antidepressivos tricíclicos, sobre os quais apresentam vantagens como a redução de efeitos colaterais, e efetividade de doses geralmente menores, gerando assim níveis plasmáticos mais baixos (Anderson, 2000).

A fluoxetina (FLU) é conhecida como “mãe” dos ISRS por ser a primeira molécula dessa classe. Desenvolvida em 1974, chegou ao mercado em 1988 por meio da indústria farmacêutica “Eli Lilly” e desde então tornou-se o fármaco antidepressivo mais prescrito em todo mundo, e, com o passar dos anos, seu uso foi aprovado para outras patologias (Rossi, Barraco e Donda, 2004).

A extensa biotransformação da FLU gera um metabólito ativo, a norfluoxetina (NOR) e diversos outros metabólitos. Acredita-se que a NOR seja responsável por parte significativa da atividade terapêutica da FLU (Kecskeméti et al., 2005), sendo portanto de interesse a determinação desse metabólito na monitorização terapêutica do fármaco.

O desenvolvimento de métodos analíticos mais sensíveis e seletivos, desde o preparo de amostra até a identificação e a quantificação das espécies de interesse, permite a obtenção de dados confiáveis para o acompanhamento clínico e farmacológico. Com essa finalidade vários métodos de análises vêm sendo desenvolvidos atualmente usando técnicas miniaturizadas como microextração em fase sólida (SPME) e microextração em fase líquida (LPME). Tais técnicas geralmente apresentam como vantagens a elevada sensibilidade, rapidez e simplicidade de execução, além de serem ambientalmente apropriadas, pois reduzem ou eliminam o uso de solventes orgânicos (Sarafraz-Yazdi e Amiri, 2010).

Fármacos são moléculas que apresentam muitas vezes polaridade acentuada, baixa volatilidade e instabilidade térmica, características incompatíveis com análises por cromatografia gasosa (GC), o que faz da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) a técnica de escolha para esse tipo de análise. Apesar disso, a técnica de GC apresenta vantagens como simplicidade, elevado poder de resolução, sensibilidade adequada, reprodutibilidade e baixo custo. Para converter analitos polares ou não voláteis em suas formas voláteis, processos de derivatização fazem-se necessários (Xu, Basheer e Lee, 2009).

Até o presente momento não existem estudos que empregam, conjuntamente, a extração por LPME e a detecção por GC na análise de FLU e NOR. Sendo assim, esse projeto desenvolveu metodologia inédita baseada na extração de FLU e NOR em plasma por LPME e análise por GC-MS com derivatização no injetor.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS)

Os fármacos antidepressivos podem ser classificados em três diferentes classes: os tricíclicos (ATC), os inibidores da monoamino oxidase (IMAO) e os ISRS. Os dois primeiros grupos foram descobertos quase que simultaneamente, na segunda metade da década de 1950, e atuam elevando o nível cerebral das monoaminas noradrenalina e serotonina (Silva, 2006).

O terceiro grupo, o dos ISRS, foi racionalmente desenvolvido na década de 1970, com finalidades psicotrópicas. Esses fármacos iniciaram uma nova era no desenvolvimento de drogas utilizadas no tratamento de transtornos psiquiátricos (Wong, Bymaster e Engleman, 1995; Vaswani, Linda e Ramesh, 2003).

O uso de ISRS é amplamente prescrito na terapêutica para depressão, transtorno obsessivo compulsivo, ataques de pânico, bulimia, fobia social e estresse pós- traumático. ISRS são antidepressivos não tricíclicos que elevam o processo de neurotransmissão serotoninérgica através da inibição neural da recaptação de serotonina em neurônios pré-sinápticos. A inibição crônica da recaptação de serotonina leva à infra-regulação de auto receptores pré-sinápticos inibitórios 5HT₁, aumentando assim a liberação de serotonina (Nevado et al., 2005).

Os ISRS vêm progressivamente tornando-se os agentes de primeira escolha no tratamento da depressão, substituindo os bem estabelecidos antidepressivos tricíclicos, provavelmente por gerarem menos efeitos colaterais e serem mais seguros. (Anderson, 2000).

Em um estudo direcionado à tolerabilidade relativa entre antidepressivos tricíclicos e ISRS, Anderson e Tomenson relataram que poucos pacientes recebendo ISRS abandonaram o tratamento comparado aos que estavam recebendo tricíclicos, e a principal razão para a descontinuação do uso foi atribuída a efeitos colaterais (Anderson e Tomenson, 1995).

Os ISRS surgiram como o maior avanço na psicofarmacologia. Eles estabeleceram a função fisiopatológica da serotonina em transtornos afetivos e da ansiedade. Além disso, eles também foram os primeiros a confirmar a inibição da recaptação de neurotransmissores como um importante princípio farmacológico. O desenvolvimento de subseqüentes ISRS ocorreu relativamente em um curto período de tempo, sendo lançados cinco ISRS sucessivamente em vários países por companhias diferentes: citalopram pela Lundbeck, fluvoxamina pela Solvay,

fluoxetina pela Lilly, paroxetina pela Smithkline-Beecham e sertralina pela Pfizer (Vaswani, Linda e Ramesh, 2003).

A Figura 1 apresenta as estruturas químicas dos ISRS disponíveis no mercado, nas quais podem ser observadas consideráveis variações estruturais entre as moléculas.

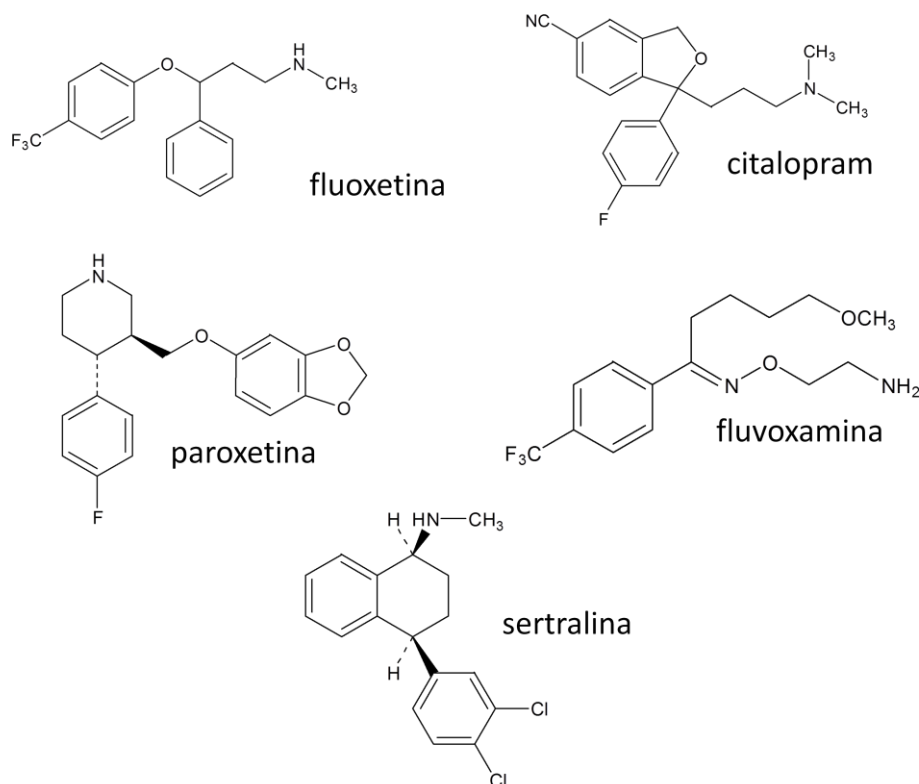


Figura 1 - Estrutura química dos inibidores seletivos da recaptção de serotonina.

Embora todos os ISRS apresentem o mesmo mecanismo de ação, as diferenças entre as estruturas moleculares fazem com que os diferentes compostos apresentem perfis farmacocinéticos diversos como demonstra a Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros farmacocinéticos de antidepressivos ISRS (Katzung, 2006).

Fármaco	Biodisponibilidade (%)	Ligação às proteínas (%)	t _{1/2} (horas)	Metabólitos ativos	Vd*
Citalopram	51-93	70 - 80	23-75	desmetil	12-16
Fluoxetina	70	94	24-96	desmetil (norfluoxetina)	12-97
Fluvoxamina	> 90	77	7-93	nenhum	> 5
Paroxetina	50	95	24	nenhum	28-31
Sertralina	nd	98	22-35	desmetil	20

*Volume de distribuição (L/Kg).

A monitorização terapêutica é pouco utilizada no ramo da psiquiatria, pois as faixas terapêuticas dos antidepressivos apresentam-se muito amplas, levando geralmente a aceitação da noção de baixa toxicidade. Além disso, a relação entre a concentração plasmática e o efeito terapêutico nem sempre é totalmente entendida (Fava et al., 1995).

Apesar disso, a monitorização terapêutica pode ser de interesse para o controle da adesão do paciente ao tratamento e, em outras situações como, insuficiência renal ou hepática, em pacientes idosos e baixa metabolização pelas isoenzimas do citocromo P450 ou administração simultânea de indutores e inibidores destas enzimas (Delmar Cantú et al., 2004; Wille et al., 2005). A metabolização da fluoxetina assim como da maioria dos antidepressivos é feita pela isoenzima CYP2D6 e a capacidade metabolizadora da população é bastante variável devido à expressão polimórfica dessa enzima. O polimorfismo da CYP2D6 pode ser um fator de risco potencial no desenvolvimento de efeitos colaterais, ou causar baixa eficácia do tratamento com antidepressivos extensivamente metabolizados por essa isoenzima, visto que ele gera taxas de metabolização extremamente variáveis em indivíduos diferentes (Charlier, 2003).

A determinação das concentrações séricas dos ISRS também pode ser útil em estudos farmacocinéticos e intoxicações agudas (Eap et al., 1996). A monitorização da adesão ao tratamento é importante tendo em vista que estudos demonstram que 32% dos pacientes de clínica geral param a medicação dentro de seis semanas do início do tratamento e 63% desses não informam ao clínico sua decisão (Maddox, Levi e Thompson, 1994).

2.1.1 Fluoxetina

A fluoxetina foi a primeira molécula desenvolvida da classe dos ISRS sendo o primeiro fármaco dessa classe disponível para o uso clínico na maioria dos países. Foi introduzida na prática clínica para o tratamento de depressão maior em 1988 e desde então vem sendo o antidepressivo mais prescrito no mundo (Rossi, Barraco e Donda, 2004).

Além do uso inicial para casos de depressão maior, a fluoxetina pode ser também utilizada em pacientes com transtorno obsessivo compulsivo, bulimia nervosa, transtorno disfórico pré-menstrual, (Rossi, Barraco e Donda, 2004), existindo inclusive estudos envolvendo ação anticonvulsivante (Kecskeméti et al., 2005).

Para o tratamento inicial de depressão e transtorno obsessivo-compulsivo com fluoxetina é recomendada a dose de 20 mg/dia, em dose única pela manhã. Não havendo melhora, considera-se o aumento das doses até 80 mg/dia sendo divididas em duas tomadas (Djordjevic et al., 2005).

A fluoxetina é quase completamente absorvida após administração oral, porém, devido ao metabolismo de primeira passagem no fígado, sua biodisponibilidade é inferior a 90% (Catterson e Preskorn, 1996).

Assim, como outros fármacos lipofílicos, a fluoxetina possui amplo volume de distribuição (Vd), entre 12 e 97 l/Kg, o qual indica extensiva acumulação nos tecidos. O Vd da fluoxetina é de longe o mais alto dentre os ISRS. Apesar do alto Vd, similar aos ATC, a acumulação de fluoxetina no cérebro é menor, quando comparada a outros ISRS (Daniel e Wojcikowski, 1997), sendo a proporção cérebro/plasma de apenas 2,6:1 comparado a 24:1 para fluvoxamina (Strauss et al., 1997).

A fluoxetina sofre extensiva conversão metabólica, sendo a isoenzima CYP2D6 do citocromo P-450 responsável pela N-desmetilação que gera seu metabólito ativo, a norfluoxetina. Além da NOR outros metabólitos também são formados (Figura 2) (Hiemke e Härtter, 2000; Djordjevic et al., 2005).

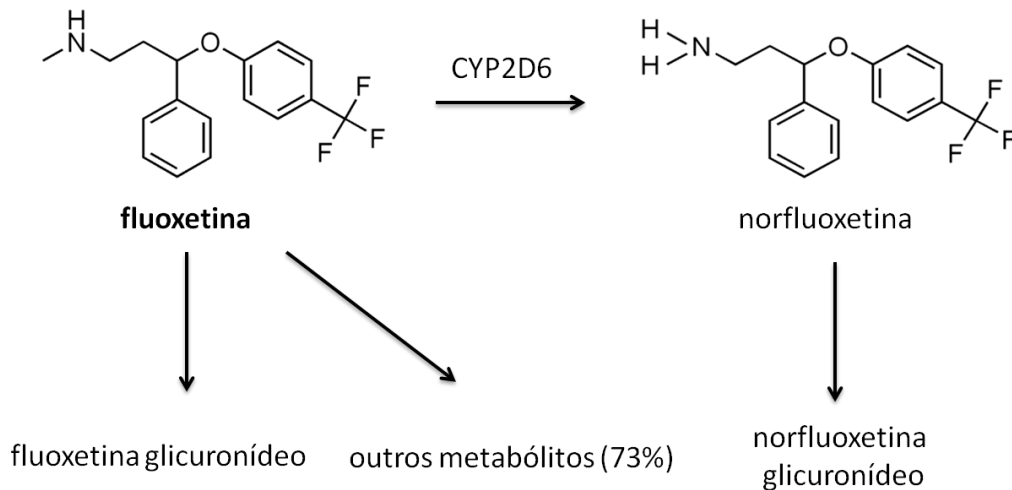


Figura 2 – Metabolismo de fluoxetina ressaltando a catálise pela isoenzima CYP2D6 em reações de fase I, adaptado de (Hiemke e Härtter, 2000).

A FLU possui longa meia vida ($t_{1/2}$) variando de 1 a 4 dias e a NOR possui $t_{1/2}$ ainda maior entre 7 e 15 dias (Gram, 1994). Devido ao elevado tempo de meia vida do fármaco e de seus metabólitos são necessárias até vinte e duas semanas para que o estado de equilíbrio seja atingido (Catterson e Preskorn, 1996).

A excreção da FLU administrada por via oral dá-se principalmente pela urina, tanto FLU quanto NOR possuem elevada meia vida de eliminação, variando entre 1 a 6 dias e 5 a 6 dias, respectivamente. Cerca de 11% da dose ingerida é excretada sob forma inalterada, e cerca de 7% sob forma de NOR (Unceta et al., 2008).

A FLU e NOR são misturas racêmicas, sendo os dois enantiômeros ativos no bloqueio do transporte da serotonina (Figura 3). Estudos apontam que os (S)-enantiômeros são mais potentes comparados aos (R)-enantiômeros, sendo essa diferença de ação de 1,5 vezes para FLU e 20 vezes para NOR (Gram, 1994; Gatti et al., 2003; Ulrich, 2003). As diferenças na biotransformação desses enantiômeros dificultam o estabelecimento da relação dose efeito para FLU, sendo que estudos clínicos prévios falharam ao tentar estabelecer claramente a correlação entre a resposta clínica e os níveis de FLU e NOR no plasma (Fava et al., 1995; Amsterdam et al., 1997).

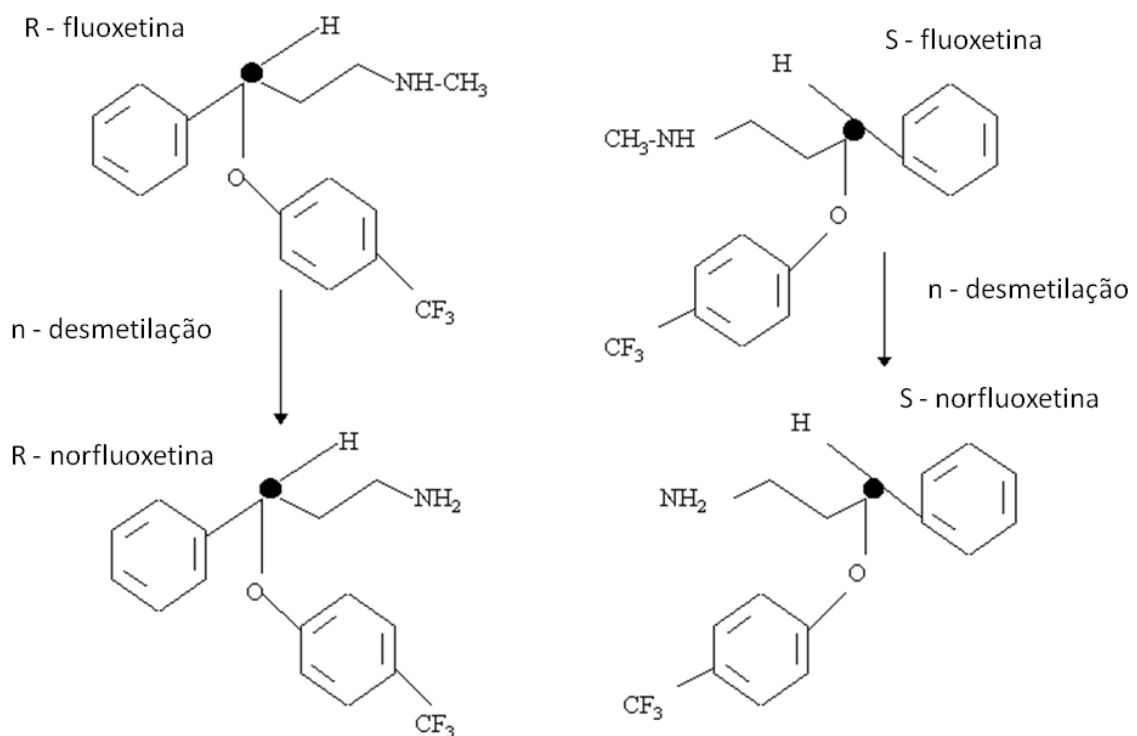


Figura 3 – Estereoisômeros da fluoxetina e norfluoxetina (Wong, Bymaster e Engleman, 1995).

No estado de equilíbrio a concentração de NOR normalmente excede a concentração de FLU. Sendo que no sangue a concentração de S-norfluoxetina é maior comparado a R-norfluoxetina (Baumann e Rochat, 1995).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para análise de FLU e NOR em matrizes biológicas, as quais, uma vez sendo amostras complexas, requerem tratamento prévio para posterior análise. Uma vasta gama de técnicas de preparo de amostra vem sendo utilizadas para a extração de FLU e NOR. Técnicas convencionais como extração líquido-líquido (LLE) (Fontanille et al., 1997; Lacassie et al., 2000; Gatti et al., 2003; Ulrich, 2003; Açikkol e Salkim, 2010; Chow et al., 2011) e extração em fase sólida (Nevado et al., 2006; Açikkol e Salkim, 2010) são comumente utilizadas. Técnicas miniaturizadas como microextração em fase sólida (Salgado-Petinal et al., 2005; Fernandes et al., 2007), microextração em barra de agitação (Fernandes et al., 2008) e LPME (Trine Grønhaug et al., 2003; Vasskog et al., 2008; de Freitas et al., 2010) e outras técnicas com injeção direta de plasma em HPLC com acoplamento de colunas (*column switching*) também foram descritas (Matsui et al., 1995; Ramaiya, March e Thomas Karnes, 1997; Santos Neto et al., 2006).

A maior parte dos métodos descritos para a análise de FLU e NOR é baseada em cromatografia, principalmente cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Trine Grønhaug et al., 2003; Fernandes et al., 2007; Unceta et al., 2007; Vasskog et al., 2008; de Freitas et al., 2010; Chow et al., 2011) e, em menor número, análises por cromatografia gasosa (GC) (Pablo Lamas et al., 2004; Salgado-Petinal et al., 2005; Fernandes et al., 2008) .

2.2 Microextração em fase líquida (LPME)

A miniaturização da LLE, ou microextração em fase líquida (LPME) foi introduzida em 1996, simultaneamente por Liu e Jeannot (Jeannot e Cantwell, 1996; Liu e Dasgupta, 1996) com a configuração de microextração em gota suspensa (SDME, do inglês, *single-drop microextraction*).

A SDME extrai compostos em uma gota de solvente orgânico que é suportada pela agulha de uma seringa cromatográfica. A Figura 4 representa esquematicamente este processo de extração.

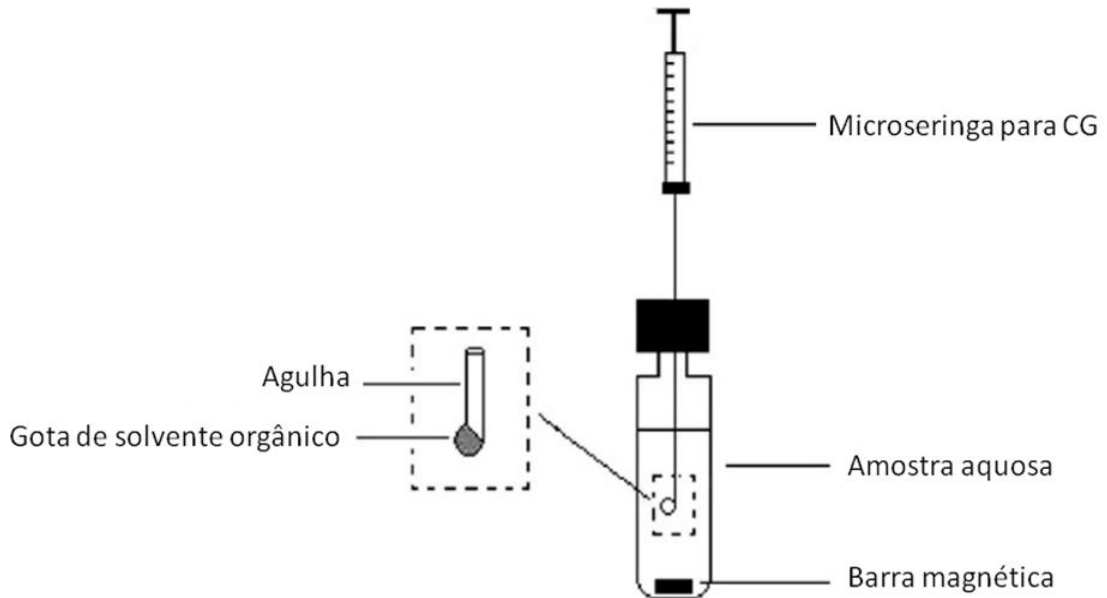


Figura 4 – Microextração em gota suspensa (SDME) (Jeannot e Cantwell, 1997).

Apesar de ser de fácil operação, rápida, barata e utilizar baixos volumes de solventes, a técnica de SDME apresenta problemas como instabilidade da gota e falta de seletividade. (Cortada et al., 2009)

Esses problemas contribuíram para o desenvolvimento da técnica de microextração em fase líquida utilizando uma fibra oca, processo conhecido como HF-LPME (*Hollow fibre - Liquid Phase Microextraction*) ou simplesmente de LPME, introduzida em 1999 por Stig Pedersen-Bjergaard e Knut Einar Rasmussen (Pedersen-Bjergaard e Rasmussen, 1999).

Pedersen-Bjergaard e Rasmussen idealizaram uma nova metodologia que combina o conceito de extrações com membranas (*supported liquid membrane*, SLM e *microporous membrane liquid-liquid extraction*, MMLLE) com o uso reduzido da razão solvente orgânico/fase aquosa, assim como na SDME. Essa técnica pode ser considerada uma evolução dos métodos de microextração com solventes (Oliveira et al., 2008). Os poros de uma membrana capilar porosa e hidrofóbica denominada fibra oca (Figura 5) são impregnados com o solvente orgânico de extração e o seu lúmen é preenchido com microlitros de uma fase aceptora. Basicamente, o analito é extraído da amostra através da fase orgânica imobilizada para a fase aceptora.

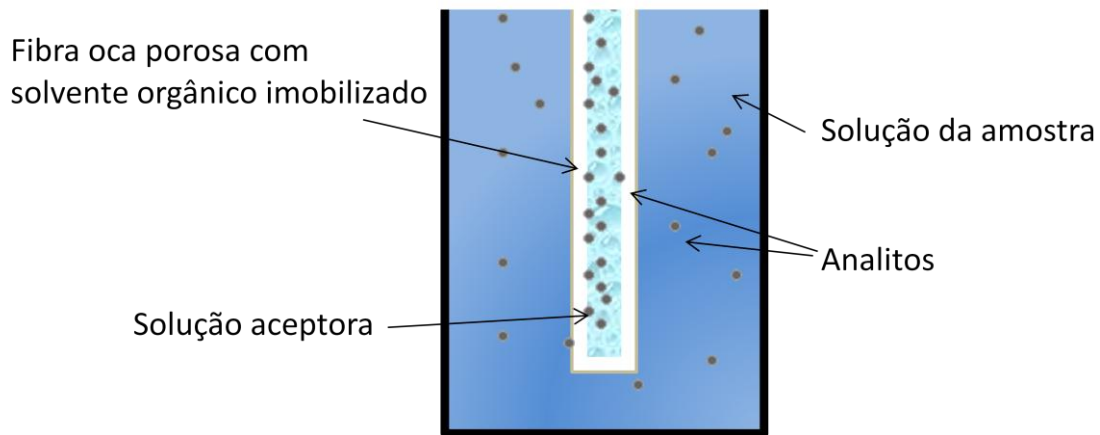


Figura 5 - Princípio básico da extração por LPME adaptado de Rasmussen e Pedersen-Bjergaard, 2004.

Dependendo da composição da solução aceptora os sistemas de extração por LPME podem apresentar duas ou três fases.

2.2.1 Sistema extrator em duas fases

No sistema bifásico o analito “A” é extraído da amostra aquosa (fase doadora) através de um solvente orgânico imiscível em água imobilizado nos poros da membrana passando para o mesmo solvente orgânico (fase aceptora), presente no lúmen da fibra. Para obtenção de resultados favoráveis neste modo de extração, o analito deverá ser moderada ou altamente hidrofóbico, podendo conter grupos ionizáveis ácidos ou básicos. (Oliveira et al., 2008)

Este processo pode ser representado da seguinte forma:

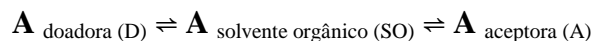


O coeficiente de distribuição é: $K = [SO]/[D]$ e é definido pela razão entre a concentração do analito no solvente orgânico e na fase doadora, em condições de equilíbrio (Psillakis e Kalogerakis, 2003).

A solução aceptora nesse sistema é diretamente compatível com GC e, por meio da evaporação do solvente e reconstituição em meio aquoso, é compatível com HPLC ou eletroforese capilar (Rasmussen e Pedersen-Bjergaard, 2004).

2.2.2 Sistema extrator em três fases

No modo trifásico o analito “A” é extraído de uma amostra aquosa (fase doadora) através de um solvente orgânico imiscível em água immobilizado nos poros da membrana, passando para uma solução aquosa (fase acceptora) presente no lúmen da fibra. A fase orgânica atua como uma barreira entre as fases acceptora e doadora (ambas aquosas), impedindo o contato entre ambas. (Oliveira et al., 2008).



Esse tipo de extração é comumente realizado para a determinação por HPLC ou EC (Rasmussen e Pedersen-Bjergaard, 2004). Esse processo é caracterizado pela relação da distribuição entre a fase orgânica, a fase doadora e a fase acceptora. O coeficiente de distribuição, no equilíbrio, é:

$$K = [A]/[D] = K_{\text{SO/D}} \cdot K_{\text{A/SO}}$$

2.2.3 Composição e configuração do dispositivo de LPME

A LPME utiliza geralmente membrana oca de polipropileno (PP), a qual é usada por ser compatível com grande quantidade de solventes orgânicos, além de possuir características relevantes para o processo de extração, tais como, pequeno tamanho do poro (0,2 µm) com excelente imobilização dos solventes orgânicos e grande área superficial da fibra facilitando o contato com a fase doadora (Rasmussen e Pedersen-Bjergaard, 2004). A Figura 6 apresenta uma micrografia eletrônica da fibra de PP comercialmente disponível.

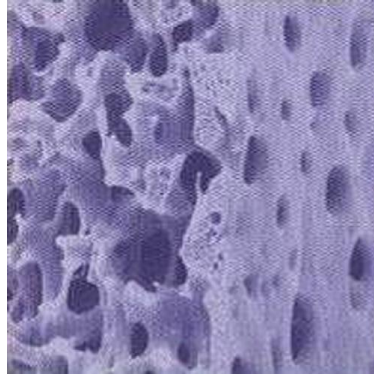


Figura 6 – Micrografia eletrônica de secção da fibra de polipropileno (Pedersen-Bjergaard e Rasmussen, 2008).

Fibras de polivilideno difluorado (PVDF) – que apresentam características interessantes à LPME, como boa resistência mecânica, estabilidade química e térmica, e resistência à radiação – vêm sendo utilizadas atualmente em processos automatizados (Cui et al., 2009). A Figura 7 apresenta uma micrografia eletrônica da fibra de PVDF mostrando a predominância de poros uniformes através da parede.

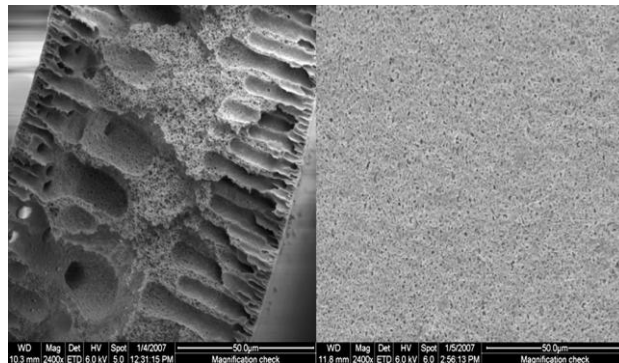


Figura 7 – Fotografia por microscopia eletrônica de varredura da fibra oca de PVDF (Cui et al., 2009).

Várias disposições e configurações diferentes foram utilizadas em extrações por LPME. A Figura 8 demonstra o primeiro modelo usado por Rasmussen e Pedersen-Bjergaard (Pedersen-Bjergaard e Rasmussen, 1999). O diâmetro interno da fibra de polipropileno é de 600 μm , com espessura da parede de 200 μm e tamanho do poro de 0,2 μm . Cada extremidade da fibra é conectada a uma agulha de aço deixando a fibra com o formato de “U”.

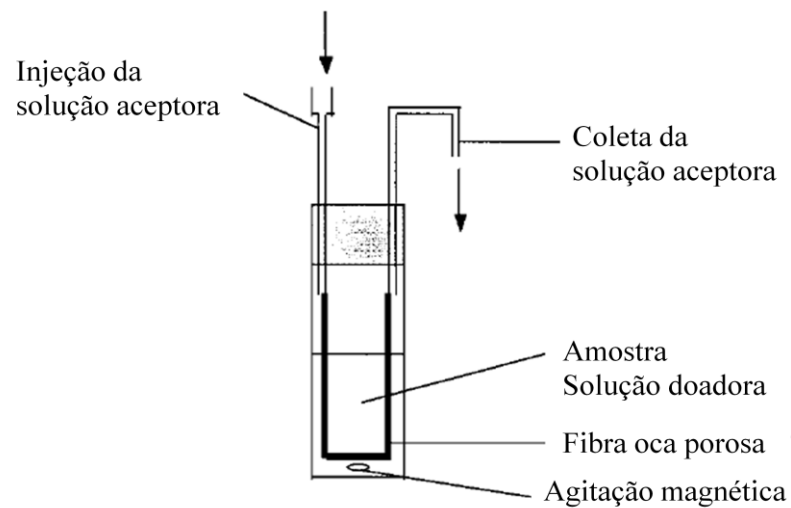


Figura 8 - Configuração da fibra oca em formato de “U” (Pedersen-Bjergaard e Rasmussen, 1999)

Esse formato contribui para excelentes extrações, mas com a desvantagem da transferência manual da solução aceptora e a difícil automação (Rasmussen e Pedersen-Bjergaard, 2004).

Essa desvantagem pode ser resolvida com a utilização de configuração linear (em forma de haste / *rod-like*) para a fibra (Figura 9).

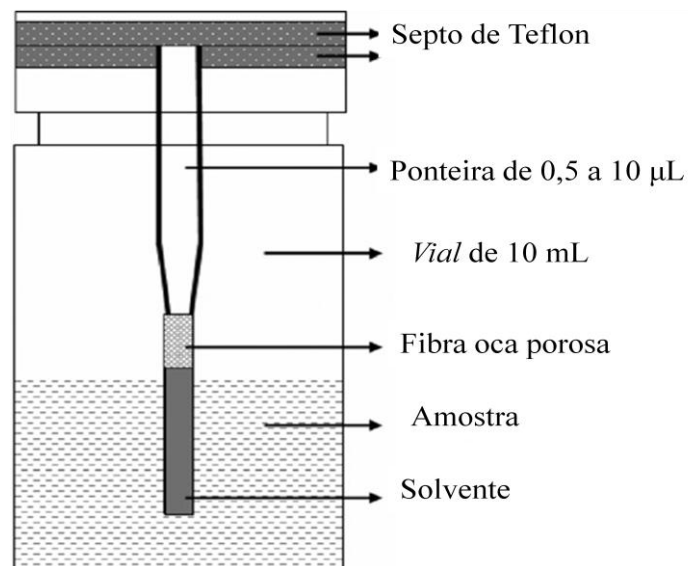


Figura 9 - LPME baseada na configuração *rod-like* (Ouyang, Zhao e Pawliszyn, 2007)

Com essa configuração, uma microseringa pode ser utilizada para introduzir e remover a solução acceptora. Alguns trabalhos com sistemas automatizados de injeção, como o auto-amostrador CTC CombiPal (Zwingen, Suíça), utilizam essa configuração (Ouyang, Zhao e Pawliszyn, 2007; Cui et al., 2009).

Outra configuração interessante foi desenvolvida por Müller et al., 2003 (Figura 10), resultando em um sistema de semi-automatização. Nesse sistema o autor utiliza uma guia de aço inoxidável para a injeção e para o suporte da fibra e um injetor automático comum para cromatógrafo a gás. Nessa configuração a fibra não é lacrada e também pode ser utilizada uma microseringa para introduzir e remover a solução acceptora. A outra extremidade da fibra é presa em um dente feito na guia para injeção, com essa extremidade da fibra aberta, foi eliminado o problema de formação de bolhas na solução acceptora.

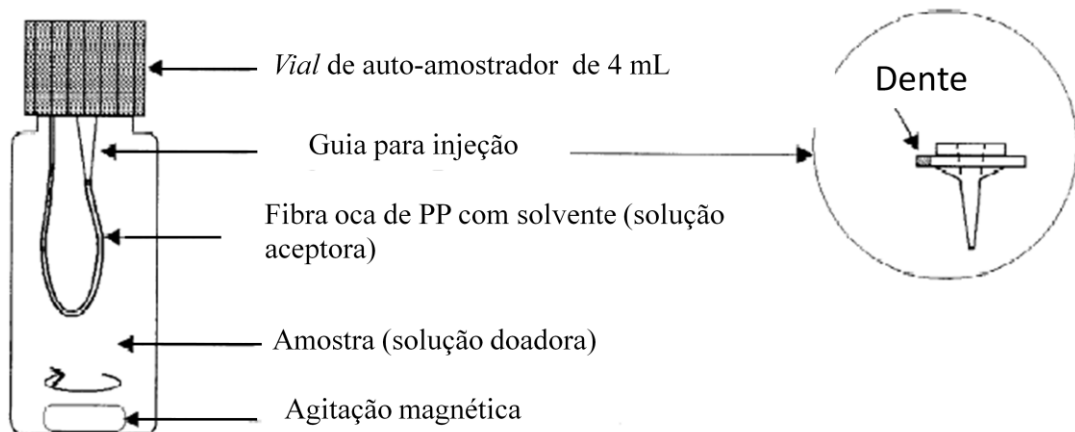


Figura 10 – Configuração para semi-automatização (Müller et al., 2003).

Outro modelo é a configuração dinâmica (Figura 11) na qual é utilizada uma bomba acoplada à seringa que faz com que a solução acceptora entre e saia da fibra oca, renovando continuamente a superfície de equilíbrio entre a fase extratora.

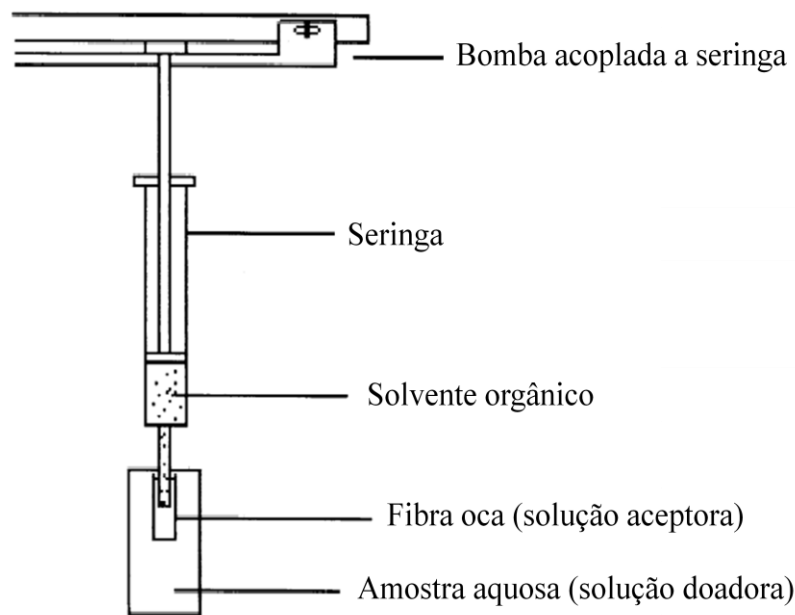


Figura 11 - LPME em configuração dinâmica (Hou, Shen e Lee, 2003).

A fim de agilizar o processo de extração por LPME alguns autores substituíram o suporte da fibra, geralmente feito por seringas de injeção, por ponteiras de plástico com pontas finas o suficiente para o encaixe das fibras.

Magalhães e Bonato desenvolveram um aparato composto de um tubo fino de vidro com tampa de plástico utilizada como apoio para duas ponteiras plásticas, as quais suportam uma fibra oca de polipropileno conforme mostrado na Figura 12. Com esse aparato foi possível a agitação simultânea de até cinco tubos com agitador Vibrax VXR (IKA, Staufen, Alemanha) aumentando assim a frequência analítica da técnica (Magalhães e Bonato, 2009).



Figura 12 - Aparato de extração por LPME para agitação simultânea (Magalhães e Bonato, 2009).

2.2.4 Otimização da técnica de HF-LPME

Além da razão das fases aceptora e doadora e de características inerentes ao analito (coeficientes de ionização e partição), alguns outros parâmetros devem ser considerados durante o desenvolvimento do método, tais como ajuste do pH da amostra, força iônica, tipo de membrana hidrofóbica, tipo de solvente orgânico, tempo e temperatura de extração, composição da solução aceptora e agitação do sistema (Psillakis e Kalogerakis, 2003). A influência desses parâmetros será discutida a seguir:

2.2.4.1 Solvente orgânico

Uma etapa crucial na otimização do método de LPME, tanto no modo de duas fases quanto no de três fases, é a seleção do solvente orgânico mais adequado para a extração. Em geral, vários solventes imiscíveis com água podem ser testados, sendo também possível o emprego de mistura de solventes (Ugland, Krogh e Rasmussen, 2000).

A escolha final do solvente deve ser baseada em várias considerações, dentre elas: baixa solubilidade ou insolubilidade em água, prevenindo a dissolução da fase orgânica na aquosa (doadora); baixa volatilidade, evitando a perda de fase orgânica durante a extração; compatibilidade com a membrana capilar utilizada; fácil impregnação nos poros da membrana e solubilidade adequada para o analito de interesse (Psillakis e Kalogerakis, 2003).

Vários solventes orgânicos têm sido utilizados, como éter diexílico, *n*-octanol, acetato de hexila, acetato de butila, acetato de dodecila, éter dibutílico e isooctanol, ou misturas desses solventes (Rasmussen e Pedersen-Bjergaard, 2004).

2.2.4.2 Tempo de extração

A transferência de massa do analito da fase aquosa para a orgânica e desta para a fase aceptora (no caso de sistemas em três fases) é um processo dependente de tempo. O processo de extração trata-se de um processo de equilíbrio e, portanto, a recuperação do analito aumenta com o tempo de extração até atingir uma situação de platô, neste ponto, o equilíbrio é atingido e a distribuição do analito entre as fases permanece constante (Oliveira et al., 2008). Muitas vezes, o tempo necessário para que o equilíbrio seja atingido é excessivamente

longo; nesses casos, a extração é feita em condições de não equilíbrio, controlando-se precisamente o tempo de extração (Ho, Pedersen-Bjergaard e Rasmussen, 2002).

2.2.4.3 Temperatura de extração

Com o aumento da temperatura os coeficientes de difusão aumentam em resposta à diminuição da viscosidade. Logo, o tempo requerido para alcançar o equilíbrio é diminuído. Por outro lado, os coeficientes de partição para a fase aceptora diminuem, reduzindo a quantidade de fármaco extraído no estado de equilíbrio. Portanto, a velocidade das extrações pode ser melhorada à custa da perda da detectabilidade do método. Contudo, a LPME normalmente é executada à temperatura ambiente, evitando-se possíveis problemas de formação de bolhas e evaporação do solvente durante a extração, já que a quantidade de solvente utilizada é muito pequena (aproximadamente 20 μL) (Oliveira et al., 2008).

A temperatura também pode afetar reações de derivatização *in situ* em LPME, aumentando a eficiência da reação e com isso a sensibilidade e velocidade da análise (Varanusupakul, Vora-adisak e Pulpoka, 2007).

2.2.4.4 Agitação da amostra

Normalmente, a agitação da amostra é aplicada rotineiramente para acelerar a cinética de extração, facilitando a difusão dos analitos através da interface fase doadora/solvente orgânico (Oliveira et al., 2008). O aumento da velocidade de agitação da fase doadora tende a incrementar a extração e a difusão do analito pela interface da fibra oca, além de melhorar a precisão do método de extração (Psillakis e Kalogerakis, 2003). Nesse sentido, podem-se empregar dispositivos magnéticos, vibratórios ou por banho de ultra-som para a agitação da amostra. As agitações por vibração ou banho ultra-sônico possuem a vantagem de eliminar contaminações cruzadas entre amostras, o que pode ocorrer na agitação induzida por barra magnética, a qual, além de adsorver analitos, pode formar bolhas de ar que tendem a aderir na superfície da fibra cilíndrica, acelerando a evaporação do solvente e introduzindo imprecisão nas medições (Shen e Lee, 2001).

Existem no mercado agitadores por vibração que agitam mais de um sistema de extração por vez, agilizando o processo de extração e facilitando análises de rotina (Magalhães e Bonato, 2009).

2.2.4.5 pH da fase doadora

Ajustes no pH da amostra podem aumentar a eficiência da extração, uma vez que tanto o equilíbrio de dissociação quanto a solubilidade de analitos ácidos e básicos são diretamente afetados pelo pH (Psillakis e Kalogerakis, 2003).

O ajuste adequado do pH resulta em uma maior razão de distribuição, garantindo elevados fatores de enriquecimento e de recuperação do analito de interesse (Pedersen-Bjergaard, Ho e Rasmussen, 2002).

2.2.4.6 Aditivos na fase doadora

Sais

A adição de sais na matriz pode aumentar a eficiência da extração. Particularmente para analitos mais polares alguns sais promovem o efeito denominado *salting-out*, ou seja, eles saturam o meio aumentando a distribuição do analito para a fase extratora. Termodinamicamente, o efeito de *salting-out* é dependente do tipo de sal e também das características do analito em questão, bem como da composição da solução em que o efeito ocorre. Por outro lado, a interação das moléculas do analito com os íons adicionados pode reduzir a difusão do analito para a fase extratora (Shen e Lee, 2001); além disso, o aumento da viscosidade da matriz pode reduzir a mobilidade dos analitos e prejudicar também a extração (Ugland, Krogh e Rasmussen, 2000). Entre os sais empregados como aditivos na fase doadora, o cloreto de sódio é o mais comum.

Modificadores orgânicos

Muitos fármacos estão ligados às proteínas das matrizes biológicas de forma bastante intensa e essas interações podem ser responsáveis por baixos valores de recuperação (Oliveira et al., 2008). As ligações fármaco-proteína ocorrem devido a interações iônicas, hidrofóbicas ou mesmo polares. As interações hidrofóbicas podem ser suprimidas pela adição de alguns solventes orgânicos à matriz contendo o fármaco de interesse. Solventes orgânicos (ex.: metanol) têm a habilidade de quebrar interações hidrofóbicas e polares (Rasmussen e Pedersen-Bjergaard, 2004). Por outro lado, os modificadores orgânicos podem afetar a distribuição do analito entre a fase aquosa e o solvente orgânico, reduzindo a eficiência da

extração, bem como favorecer a saída do solvente orgânico do interior do lúmen para a amostra no sistema de duas fases.

2.3 Análises de fármacos por GC

Recentemente muitos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de melhorar a detecção de fármacos em fluidos biológicos. As técnicas mais empregadas são as cromatográficas, principalmente GC, GC-MS, HPLC, LC-MS, e técnicas de imunoenaios. As técnicas cromatográficas têm sido referência para análise de fármacos em fluidos biológicos (Alves, 2006).

A análise de fármacos por GC muitas vezes é inviabilizada devido a algumas características dessas moléculas como polaridade acentuada, baixa volatilidade e instabilidade térmica, o que faz da HPLC a técnica de escolha. Entretanto a técnica de GC por ser mais simples, possuir elevado poder de resolução, sensibilidade adequada, reprodutibilidade e baixo custo se mostra como interessante alternativa para análise de fármacos. Para que isso seja possível é necessário converter moléculas polares ou não voláteis em suas formas voláteis, sendo necessários processos de derivatização (Xu, Basheer e Lee, 2009).

2.3.1 Derivatização química

A derivatização química é um procedimento que a maioria dos químicos analíticos deseja evitar por várias razões. Primeiro, os reagentes e operações adicionais podem levar a incertezas potenciais na quantificação. Segundo, a necessidade de derivatização introduz uma etapa adicional ao processo de preparo de amostras, sendo um inconveniente para a operação e, terceiro, a exposição ao reagente derivatizante é indesejável em altos níveis, sendo preferível evitá-los se possível (Xu, Basheer e Lee, 2009).

Apesar dos processos de derivatização, em geral, serem demorados e onerosos, técnicas de derivatização *in situ* ou *online* podem ser feitas sem consumo adicional de tempo, visto que estas envolvem simplesmente a adição do reagente na amostra líquida ou a injeção simultânea do derivatizante no cromatógrafo (Fernandes et al., 2008; Xu, Jiang e Li, 2010). A derivatização é crucial para muitas aplicações em química analítica, por exemplo, para

assegurar que o analito seja convertido em sua forma adequada à análise, tornando possível ou aumentando sua detectabilidade (Xu, Basheer e Lee, 2009).

Em extrações por LPME, diversos esquemas de derivatização já foram empregados até o momento. A reação de derivatização pode ocorrer antes da extração dos analitos (derivatização pré-extração). Nesse caso, os analitos normalmente possuem baixos coeficientes de partição e a derivatização é necessária para o procedimento de extração, todavia a derivatização pode requerer condições especiais que podem não ser favoráveis ao processo de extração (Xu, Basheer e Lee, 2009). Outro esquema possível é a adição prévia dos reagentes de derivatização à solução da amostra ou à solução aceptora (derivatização *in situ*). Derivatização *in situ* refere-se à reação ocorrendo dentro da solução da amostra ou da fase aceptora durante o processo de extração (Leinonen et al., 2006; Chiang e Huang, 2008; Liu et al., 2009). Essa estratégia é considerada benéfica porque a derivatização e extração em apenas uma etapa é conveniente, economiza tempo, é simples e de fácil operação.

A reação de derivatização também pode ser realizada após o processo de extração (derivatização pós-extração), isto é, converter os analitos em suas formas compatíveis com os processos de separação e detecção subsequentes. Esse processo pode ser feito tanto fora do cromatógrafo a gás (derivatização *off-line*) quanto dentro do sistema cromatográfico (derivatização *online*). Nessa configuração a derivatização é feita, na maioria das vezes, injetando simultaneamente o derivatizante e a amostra extraída, e pode ser chamado de “*Injection port derivatization*” ou “*on-column derivatization*” (Basheer e Lee, 2004; Zhang e Lee, 2006; Miki et al., 2008; Zhang e Lee, 2009).

2.3.2 Derivatização no injetor

O ato de injetar derivatizantes concomitantemente à amostra, com o objetivo de derivatizar analitos no interior do sistema cromatográfico é conhecido na literatura científica por diferentes nomes.

A primeira utilização dessa técnica da qual se tem registro data de 1976, na qual Rasmussen desenvolveu um método para análise quantitativa de morfina em GC utilizando a técnica de derivatização denominada nesse primeiro momento de “*on-column silylation*” (Rasmussen, 1976). Seis anos mais tarde o mesmo autor em parceria com Christophersen e Hovland desenvolveu um método para análise de fenol-alquilaminas, através de injeção dupla

com dois derivatizantes diferentes; e eles o denominaram “*flash-heater derivatization*” (Christophersen, Hovland e Rasmussen, 1982).

Atualmente os dois nomes mais comuns para esse tipo de análise são “*Injection port derivatization*” (Basheer e Lee, 2004; Wu et al., 2009; Zhang e Lee, 2009; Tzing e Ding, 2010; Xu, Jiang e Li, 2010; Prieto et al., 2011) e “*on column derivatization*” (Zhang e Lee, 2006; Bai-Juan et al., 2007). Entretanto esta última denominação é mais bem utilizada para processos de derivatização que favoreçam a reação dentro da coluna como técnica de injeção dupla desenvolvida por Christophersen e colaboradores (Christophersen, Hovland e Rasmussen, 1982) e de injeção em duas etapas, desenvolvida por Miki e colaboradores, na qual o injetor é programado com um intervalo de 3 segundos entre a injeção da amostra e a subsequente injeção do derivatizante (Miki et al., 2008). A Figura 13 demonstra o funcionamento da técnica de derivatização no injetor em duas etapas. Inicialmente a amostra é injetada no cromatógrafo e por diferença de volatilidade é separada do solvente, que segue rapidamente pela coluna. Em seguida a amostra, livre do solvente, recebe o derivatizante no injetor e entrada da coluna onde acontece a derivatização. A sobra de derivatizante elui preferencialmente e os analitos derivatizados continuam a corrida cromatográfica sendo separados dos interferentes e finalmente detectados.

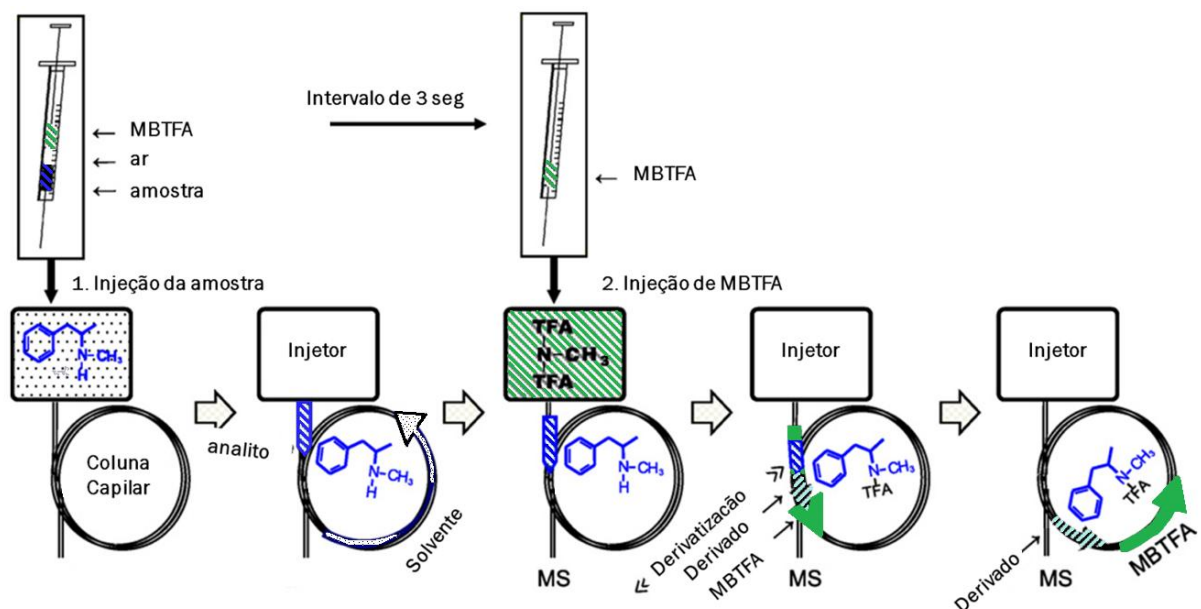


Figura 13 – Mecanismo de *on column derivatization* com injetor de duas etapas usando MBTFA, adaptado de Miki et al., 2008.

Além de “*Injection port derivatization*” e “*on column derivatization*” alguns autores também utilizam o termo “*online*” para se referir a esse modo de derivatização (Docherty e Ziemann, 2001; Hidvégi et al., 2006).

Independente do nome pelo qual a técnica é tratada é de comum acordo que a derivatização no injetor é um processo conveniente de derivatização, pois reduz significativamente o consumo de derivatizantes, sendo gasto normalmente microlitros; bem como simplifica o preparo de amostras, diminuindo tempo e trabalho, além de minimizar o contato com reagentes tóxicos (Docherty e Ziemann, 2001; Xu, Jiang e Li, 2010).

Os principais derivatizantes utilizados em processos de derivatização no injetor são agentes de silição como N,O-bis-(Trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) (Docherty e Ziemann, 2001; Bai-Juan et al., 2007; Wu et al., 2009; Tzing e Ding, 2010) e de trifluoroacetilação como o n-metil bis-trifluoroacetamida (MBTFA) (Hidvégi et al., 2006; Miki et al., 2008).

2.3.3 Derivatização com MBTFA

O processo de derivatização com MBTFA é feito por acilação, ou seja, conversão de compostos com hidrogênios ativos como -OH, -SH e -NH₂ em ésteres, tioésteres e amidas. A acilação é uma das técnicas mais utilizadas para a derivatização de aminas primárias e secundárias. A Figura 14 exemplifica esse tipo de derivatização utilizando a reação de FLU com MBTFA.



Figura 14 – Reação de acilação de FLU com MBTFA.

A derivatização de moléculas com MBTFA para análise por GC é bastante utilizada em diversos tipos de análises. Seu uso é mais comum em análises de diversos tipos de anfetaminas (Huang et al., 2005; Hidvégi et al., 2006; Cordero e Paterson, 2007; Miki et al., 2008), sendo também utilizada na análise de opióides, cocaína e diazepam (Cordero e Paterson, 2007), 3-cloro-4-(diclorometil)-5-hidroxi-2(5H)-furanona (mutagen X) (Kubwabo et al., 2009), glicosídeos de ácidos biliares (Iida et al., 2004), efedrinas (Spyridaki et al., 2001) e de alguns fármacos como carvedilol (Myung e Jo, 2005) e sibutramina (Sardela et al., 2009).

O MBTFA é bastante volátil e por ter como produto final de derivatização a *n*-metil trifluoroacetamida não causa danos a coluna do GC (Kataoka, 1996). Sendo assim, reações de derivatização *online* com MBTFA são possíveis (Hidvégi et al., 2006; Miki et al., 2008). O processo de derivatização com MBTFA também pode ocorrer *offline*, ou seja, antes da análise cromatográfica (Spyridaki et al., 2001; Iida et al., 2004; Huang et al., 2005). Outra utilidade do MBTFA é em processos de acilação seletiva após trimetil sililação (Kataoka, 1996), esse processo é denominado processo duplo de derivatização e é realizado para aumentar a detectabilidade e abundância de fragmentos em detecções por MS (Myung e Jo, 2005; Cordero e Paterson, 2007; Sardela et al., 2009).

2.3.2 Análise de fármacos por LPME-GC

Como citado anteriormente no item 2.2.1, a solução aceitadora no sistema de LPME em duas fases é diretamente compatível com a análise por GC. Sendo assim, todos os artigos descritos até o momento para análise de fármacos por GC utilizando LPME como processo de preparo de amostras adotaram esta configuração.

Enquanto a extração por LPME baseada em três fases já foi apresentada em um número relativamente grande de publicações, apenas um número limitado de informações está disponível para a extração de fármacos por LPME no modo bifásico (Pedersen-Bjergaard e Rasmussen, 2005).

A Tabela 2 apresenta alguns métodos por LPME-GC na análise de fármacos.

Tabela 2 – Aplicações da técnica LPME-GC na análise de fármacos.

Fármaco	Amostra	Fase aceitadora	Referência
Diazepam, prazepam	Plasma	<i>n</i> -octanol: éter hexílico	(Ugland, Krogh e Rasmussen, 2000)
Diazepam, prazepam	Urina	<i>n</i> -octanol: acetate de butila	(Ugland, Krogh e Rasmussen, 2000)
Fármacos básicos	Plasma	<i>n</i> -octanol	(Rasmussen et al., 2000)
Prometazina, haloperidol	Plasma, urina	<i>n</i> -octanol	(Ho, Pedersen-Bjergaard e Rasmussen, 2002)
Metadona	Plasma, urina	éter diexílico	(Ho, Pedersen-Bjergaard e Rasmussen, 2002)

Ibuprofeno e carbamazepina	Água	<i>n</i> -octanol	(Müller et al., 2003)
Esteróides anabolizantes	Urina	<i>n</i> -octanol	(Leinonen et al., 2006)
Hormônios esteróides	Água	éter diexílico	(Zorita, Hallgren e Mathiasson, 2008)
Ibuprofeno, naproxeno e cetoprofeno	Água	<i>n</i> -octanol	(Es'haghi, 2009)
Clembuterol, metoprolol e propranolol	Urina	metilbenzol	(Liu et al., 2009)
Flunitrazepam	Plasma, urina	p-xileno: <i>n</i> -octanol	(Cui et al., 2009)
Ibuprofeno, cetoprofeno, naproxeno e ácido clofibríco	Água	1-octanol	(Zhang e Lee, 2009)
Prometazina, promazina, clorpromazina e trifluoperazina	Urina	tolueno	(Xiao e Hu, 2010)
Cafeína e anfetamina	Urina	o-xileno	(Xiong et al., 2010)
Tramadol	Plasma e urina	dodecano / acetonitrila	(Ghambarian, Yamini e Esrafilí, 2011)

2.4 Otimização de métodos analíticos por estratégia multivariada

Na otimização de um procedimento analítico existe a necessidade de ajustarem-se muitas variáveis para o estabelecimento das melhores condições para a análise. A realização desse processo usando uma otimização univariada convencional pode consumir muito tempo, trabalho e material. Outro inconveniente da estratégia univariada está em não considerar as interações existentes entre as variáveis, o que torna improvável encontrar os valores ótimos procurados. Recentemente, procedimentos envolvendo otimização por técnicas multivariadas vêm sendo muito utilizados no desenvolvimento de métodos analíticos por serem mais econômicos e efetivos, além de permitir que mais de uma variável seja otimizada simultaneamente (Bezerra, 2003).

2.4.1 Planejamentos fatoriais de dois níveis

Planejamentos fatoriais de dois níveis são geralmente utilizados em investigações preliminares, quando se deseja saber se determinados fatores têm ou não influência sobre a resposta, e não se está ainda preocupado com uma descrição muito rigorosa dessa influência (Bezerra, 2003).

Para estudar o efeito de qualquer fator sobre a resposta é preciso variá-lo e observar o resultado dessa variação. Isto implica na realização de ensaios em pelo menos dois níveis para cada fator. Se a combinação de K fatores é investigada em dois níveis, um planejamento fatorial consistirá de 2^K experimentos. Os níveis dos fatores são dados pelos sinais menos (-) para o nível inferior e mais (+) para o nível superior. Um nível zero (0) pode também ser incluído em replicatas como um ponto central no qual todas as variáveis estão em seu valor médio, esse ponto possibilita identificar relações não lineares no intervalo estudado, bem como estimar o erro experimental sem a necessidade de replicatas de todo o planejamento (Neto, Scarmínio e Bruns, 1996).

2.4.2 Metodologia de superfícies de resposta

A metodologia de superfície de resposta é uma técnica de otimização desenvolvida por G. E. P. Box na década de 50, que consiste em um grupo de técnicas matemático-estatísticas utilizadas para análise e modelagem de problemas onde uma resposta particular é função de diversas variáveis e o principal objetivo é otimizar essa resposta (Bosque-Sendra et al., 1995).

As superfícies representam uma boa maneira de ilustrar graficamente a relação entre diferentes variáveis experimentais e as respostas, oferecendo valiosas informações sobre o comportamento das variáveis na região estudada (Bezerra, 2003).

Stalikas et al. descreveram uma série de opções possíveis e já descritas para a otimização de microextrações por esquemas fatoriais (Stalikas et al., 2009). Diversos trabalhos vêm sendo publicados utilizando diferentes planejamentos fatoriais para a otimização do processo de extração por LPME, no modo de duas fases (Saleh et al., 2009) bem como no modo de três fases (Wu e Lee, 2005; Tahmasebi, Yamini e Saleh, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento de método de microextração em fase líquida (LPME) como técnica de preparo de amostra de plasma para análise por cromatografia gasosa com derivatização no injetor de FLU e NOR, visando sua aplicação na monitorização terapêutica de pacientes que fazem uso do fármaco.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliação prévia da efetividade da extração de FLU e NOR por LPME de duas fases.
- Estudo da melhor estratégia de derivatização testando técnicas *off-line*, *in situ* e no injetor com diferentes tipos de derivatizantes e condições de reação.
- Otimização das condições cromatográficas para obtenção da melhor detectabilidade, eficiência e resolução na separação de FLU e NOR por GC-MS com derivatização no injetor.
- Otimização das variáveis da técnica de LPME: volume de amostra e sua diluição; precipitação prévia de proteínas; solvente de extração (fase aceptora); tempo de extração; velocidade e modo de agitação da amostra; uso de modificador orgânico na amostra; adição de sal (*salting-out*); pH da fase doadora, por estratégias multivariadas (planejamento fatorial).
- Validação do método de acordo com os parâmetros preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa): linearidade, precisão, limites de detecção e de quantificação, exatidão, recuperação e seletividade.
- Aplicação do método LPME-GC-MS na análise de plasma de pacientes em tratamento com FLU.

4 RESULTADOS

Conforme descrito nas normas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, artigo 22, a critério do orientador e do discente, a dissertação poderá ser apresentada sob a forma de 01 (um) volume contendo: uma revisão de literatura, 01 artigo científico (número mínimo), tendo o mestrando como primeiro autor, representativo dos resultados obtidos no desenvolvimento da pesquisa proposta no programa.

No presente trabalho, os resultados serão apresentados a seguir, na forma de artigo submetido para publicação em periódico da área de Farmácia.

4.1 Artigo

O artigo apresentado a seguir consiste do desenvolvimento e validação de metodologia para detecção de fluoxetina e norfluoxetina em plasma utilizando LPME como técnica de extração e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com derivatização no injetor para análise, e foi submetido à revista *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, encontrando-se em fase de análise pelos revisores.

Analysis of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma by liquid-phase microextraction and injection port derivatization GC-MS

Antônio Felipe Felicioni Oliveira¹, Eduardo Costa de Figueiredo¹, Álvaro José dos Santos-Neto^{2*}

¹ Federal University of Alfenas, Faculty of Pharmaceutical Sciences, R. Gabriel Monteiro da Silva 714, CEP 37130-000, Alfenas, MG, Brazil

² University of São Paulo, Institute of Chemistry of São Carlos, Av. Trabalhador São-carlense 400, Caixa Postal 780, CEP 13566-590, São Carlos, SP, Brazil

* Corresponding author. Tel +55 (16) 3373-8657 /Fax +55 (16) 3373-9975

E-mail address: *alvarojsn@iqsc.usp.br*

Abstract

A two-phase liquid phase microextraction using a hollow fiber combined with injection port derivatization and gas chromatographic analysis was developed for extracting and detecting fluoxetine (FLU) and norfluoxetine (NOR) in human plasma. Simultaneous extraction in a multiple tube shaker was used and, afterward, the organic phase was simply injected together with the derivatizing agent n-methyl-bis trifluoroacetamide (MBTFA). Factors influencing injection port derivatization, and several extraction parameters were optimized. Under optimal conditions the proposed method provided linearity between 10 and 500 ng mL⁻¹ ($R^2 = 0.9973$) for FLU, and between 15 and 500 ng mL⁻¹ ($R^2 = 0.9972$) for NOR. Intra-assay precision (RSD) between 2.3 and 14.1% and inter-assay between 5.4 and 14.2% were obtained, with detection and quantification limits of 3 and 10 ng mL⁻¹, and of 5 and 15 ng mL⁻¹ for FLU and NOR, respectively, using selective ion monitoring mode. Selectivity, short term stability and extraction efficiency were also evaluated. This method was simple, cheap, and environmentally friendly, yielding significantly reducing of solvents and derivatization agent consumption. The method was successfully applied to the analysis of samples from 5 patients under fluoxetine treatment.

Keywords: *fluoxetine, norfluoxetine, LPME, GC-MS, injection port derivatization, MBTFA*

1. Introduction

Fluoxetine (FLU) was the first molecule developed in the class of selective serotonin reuptake inhibitors and the first drug of this class available for clinical use at most countries, it was introduced into clinical practice for the treatment of major depression in 1988 and since then it has been the most prescribed antidepressant in the world [1]. The FLU dosage administered to depressed patients varies between 20 and 80 mg day⁻¹ [2] and its therapeutic plasma concentration is in the range of 50-500 ng mL⁻¹ [3]. Fluoxetine undergoes extensive metabolic conversion being the CYP2D6 isoenzyme of cytochrome P-450 responsible for N-demethylation, therefore, generating its active metabolite, norfluoxetine (NOR) [2, 4].

Determination of fluoxetine in biofluids is necessary in therapeutic drug monitoring (TDM), in new formulation development, as well as in analytical and forensic toxicology [5]. Several methods have been developed for analysis of FLU and NOR in biological matrices, which are complex and require sample pretreatment for analysis. A wide range of sample preparation techniques has been used for the extraction of FLU and NOR. They include conventional techniques such as liquid-liquid extraction (LLE) [6-11] and solid phase extraction (SPE) [7, 12]; some miniaturized techniques, such as solid-phase microextraction (SPME) [13, 14], stir bar sorptive extraction (SBSE) [15] and liquid-phase microextraction (LPME) [16-18]; as well as techniques for direct injection of plasma by coupling of HPLC columns (column switching) either in conventional [19] or in miniaturized formats [5, 20].

Hollow-fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME) is an extraction technique that combines, concentration and sample clean-up in one step, being introduced by Pedersen-Bjergaard and Rasmussen in 1999 [21]. This technique is based on the use of disposable, porous, hollow fibers made of polypropylene which retains the acceptor solution inside, shielding it.

Most of the methods described for analysis of FLU and NOR are based on chromatography [11, 15, 18, 22, 23], especially high performance liquid chromatography technique (HPLC) and less often gas chromatography technique (GC).

Drug molecules are often polar, low volatile and thermal instable compounds, and, therefore, presents low compatibility with GC analysis. Despite this, GC analysis is simple, sensitive, cheap and environmentally friendly. In most cases derivatization processes are necessary to drug analysis in a GC system.

To ease the derivatization process, which ordinarily introduce an additional step in sample preparation and expose the analyst to toxic agents [24], in situ or online process can be implemented without additional consumption of time [15, 25].

Injection port derivatization (IPD) was used for the first time by Rasmussen in 1976 [26]. It is an attractive approach whereas reduce significantly the derivatizing agent consumption, simplify sample preparation reducing time and labor, and minimize contact with toxic reagents [25, 27].

The aim of this study was to develop and validate a sample preparation method using two-phase HF-LPME, coupled to IPD/GC-MS, for analyzing fluoxetine and its active metabolite, norfluoxetine, in plasma samples. Factors influencing injection port derivatization, including carrier gas flow rate, injector and column temperatures, high-pressure injection mode (HPI), and type of insert liner were investigated and discussed. Parameters which affected extraction efficiency (plasma proteins precipitation, dilution of the sample, pH and concentration of buffer solution, type of organic solvent, volume of organic solvent, stirring speed and extraction time) were also optimized. Finally, the method was successfully applied to determine FLU and NOR in plasma from patients under fluoxetine treatment, being a simple and interesting alternative to LC-MS/MS analysis but still reaching the confidence of mass spectrometry in a different approach.

2. Material and methods

2.1. Reagents and standard solutions

Fluoxetine hydrochloride and norfluoxetine hydrochloride were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Nortriptyline (NTL) was obtained from USP[®] (Maryland, USA). Analytical-grade solvents were utilized, including *n*-octanol and *n*-hexyl ether from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). N-methyl-bis(trifluoroacetamide) (MBTFA) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Ultrapure water was provided by a Milli-Q water purification system from Millipore Company (Bedford, USA). The following other chemicals were used: sodium dihydrogen phosphate from Vetec[®] (Duque de Caxias, Brazil), sodium sulfate from Reagen[®] (Rio de Janeiro, Brazil), HPLC-grade methanol from J.T. Baker

(Philipsburg, USA), zinc sulfate heptahydrate from Proquimios[®] (Rio de Janeiro, Brazil) and sodium hydroxide from Labsynth (Diadema, Brazil).

Stock solutions of FLU, NOR and NTL were prepared in methanol at $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$, with working solutions at $1,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, using the appropriate dilution factor in methanol. Solutions were stored at $-20 \text{ } ^\circ\text{C}$ and protected from light, allowing them to remain stable for at least 5 weeks [28].

2.2 Plasma samples

The human plasma samples used for LPME optimization and method validation were provided by healthy volunteers who were not in use of drugs. Real plasma samples were collected from 5 patients under treatment with fluoxetine. Blood samples from these volunteers were collected immediately prior to drug administration (minimum plasma concentration). The study was approved by the Research Ethics Committee of the Institution and the individuals signed an informed consent form to participate, after receiving information about the aim of the research.

All blood samples were collected in Vacutainer[®] heparinised tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). They were subsequently centrifuged for 5 min at 3500 rpm and then submitted to plasma precipitation processes (adapted from Humphries et al.) [29], using 20% zinc sulfate (w/v) in 0.5 mol L^{-1} NaOH solution as precipitant agent. The precipitant was added at 1:10 ratio to plasma samples, vortex for 30 seconds, let stand for 10 minutes and then centrifuged for 15 min at 3,500 rpm and the supernatant was used for posterior analysis.

2.3 Liquid-phase microextraction procedure

The Q3/2 Accurel polypropylene hollow fiber was bought from Membrana[®] (Wuppertal, Germany). The inner diameter of the hollow fiber was $600 \text{ } \mu\text{m}$, the thickness of the wall was $200 \text{ } \mu\text{m}$, and the pore size $0.2 \text{ } \mu\text{m}$. A homemade extraction device consisted of two gel-loading round tips (Sorenson Bioscience, Salt Lake City, USA) assembled in a polyurethane screw cap and 5 ml glass vials were used. For each extraction a new 3.7 cm length hollow fiber was placed between the two tips ends and subsequently dipped for a 5 s

period into the organic solvent used for impregnation. After impregnation, the same organic solvent was injected into the hollow fiber with a micro syringe, and subsequently the fiber was placed in the sample solution. An orbital vortex for up to 40 test tubes (Marconi, Piracicaba, Brazil) was employed for simultaneous stirring of the extraction systems.

2.4. Chromatographic system

Sample analyses were performed on a GC-MS 2010 Plus Shimadzu[®] with autosampler 20i+S, and in a Rtx[®] 5 Sil MS column (30 m, 0.25 mm, 0.25 μm) from Restek[®]. The oven temperature was programmed to increase from 140 to 300 °C (held for 6 min) at a rate of 40 °C min^{-1} . Helium was used as carrier gas at a column flow of 1.7 mL min^{-1} . Injector, interface and ion source temperatures were 300, 280 and 200 °C, respectively. MS was operated in EI mode at 70 eV, using SIM mode (m/z 244, 117 and 140 for FLU, 230, 117 and 125 for NOR and 232, 217 and 359 for NTL).

After extraction, the acceptor solution was flushed into a 50 μL polyspring glass insert vial (Phenomenex[®], Torrance, USA) located inside the auto injector and finally, 2 μL aliquot of the extract and 1 μL of MBTFA were autoinjected into the GC-MS instrument for injection port derivatization and detection.

2.5 Method validation

The method was validated for linearity, precision, detection and quantification limits, accuracy, extraction efficiency, short term stability and selectivity; these studies were conducted in drug-free plasma samples (blank samples). The standard calibration curve built in human plasma samples were spiked with FLU and NOR at concentrations of LQ, 50.0, 100.0, 250.0, 400.0 and 500.0 ng mL^{-1} , as well as with 100 ng mL^{-1} of the internal standard, nortriptyline (six replicates per concentration). These samples were prepared and analyzed using the optimized LPME and IPD procedure. Calibration curves were plotted with peak area ratios of analyte and I.S. versus analyte concentration. The limits of detection and quantification were determined at a signal-to-noise ratio (S/N) of 3 and 10 respectively.

The intra-assay precision was evaluated by analysis of FLU and NOR-spiked samples at concentrations of 50.0, 250.0 and 500.0 ng mL⁻¹ (n = 6 per concentration). The inter-assay precision was carried out for the same concentration as above for three consecutive days (n = 3 per concentration). These results were expressed as coefficients of variation (%). Accuracy was determined by spiking plasma samples with 50, 250 and 500 ng mL⁻¹ of FLU and NOR (n = 3 per concentration). After LPME extraction and chromatographic analysis, results were compared to the theoretical added values.

The short term stability of analytes in the acceptor phase was studied for a period of 10 h at room temperature. Selectivity of the method was evaluated by analyzing spiked plasma samples that were obtained from six individuals, four normal samples, one haemolysed and another lipaemic and for chromatography behaviour of other drugs (venlafaxine, bupropion, sertraline, paroxetine, desipramine, amitriptylyne, imipramine, clomipramine and doxetine) add to the plasma and analyzed. Extraction efficiency was calculated from plasma samples spiked with 50, 200 and 400 ng mL⁻¹ of FLU and NOR, in triplicate for each concentration. These spiked solutions were submitted for analysis via HF-LPME/IPD-GC-MS and the results were compared with those obtained by direct acceptor phase addition of the same analyte quantities.

3. Results and discussion

3.1 Injection port derivatization

For the injection port derivatization, the injector was set to solvent flash injection mode. In this mode the injector needle aspirates first 1 µL of pure MBTFA from the appropriate vial, then a gap of air to contact with moisture and 2 µL of sample extract dissolved in appropriated solvent is aspirated from the sample vial. The glass liner was packed with silanized glass wool to increase precision and peak areas.

Several solvents were tested to injection (i.e. methanol, toluene, ethyl acetate) however only less volatile solvents as n-hexyl ether and n-octanol provide satisfactory repeatability.

A rapid optimization of parameters which can affect the IPD process was done. Injector temperature, column initial temperature and carrier gas flow were evaluated in a 2³

factorial design, values between 250 - 300 °C to injector, 70 - 140 °C to column and 0.9 - 1.7 ml min⁻¹ to flow were used.

As shows in Pareto chart (Figure 1), injector temperature, column initial temperature and carrier gas flow had a positive influence. The injector temperature showed the lower positive influence and was maintained at 300 °C since it was already near the GC settable limit. The carrier gas flow and column temperature were optimized and based on the absolute results, the selected condition was 1.7 mL min⁻¹ and 140 °C.

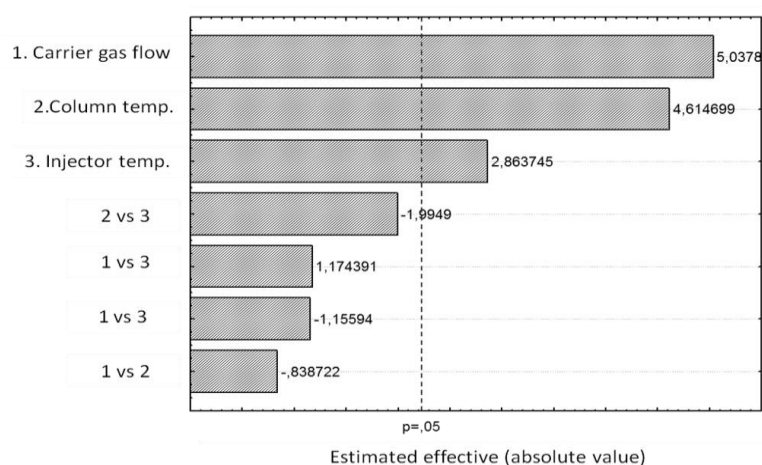


Figure 1. Pareto chart obtained from 2³ design for IPD of fluoxetine.

High pressure injection mode (HPI) and type of inlet liner were also evaluated for resolution and precision, the optimum conditions were HPI of 250 kPa and split type insert liner.

Figure 2 shows chromatogram of FLU, NOR and NTL (internal standard) using the optimized IPD and chromatographic conditions. The retention time of antidepressants were: 3.59 (FLU), 3.77 (NOR) and 4.78 (NTL, I.S.) min.

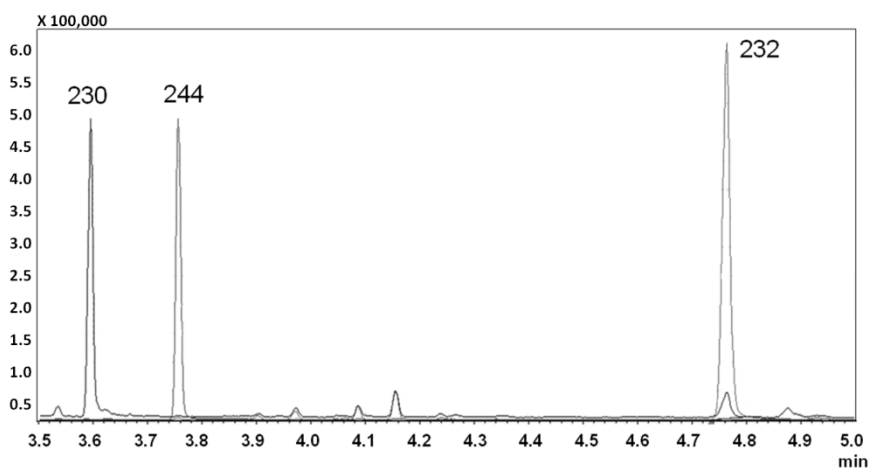


Figure 2. Chromatogram of derivatized NOR (m/z 230), FLU (m/z 244) and NTL (m/z 232) under optimized conditions.

Figure 3 shows the mass spectra of FLU and NOR unchanged and as acylated derivative after IPD with MBTFA.

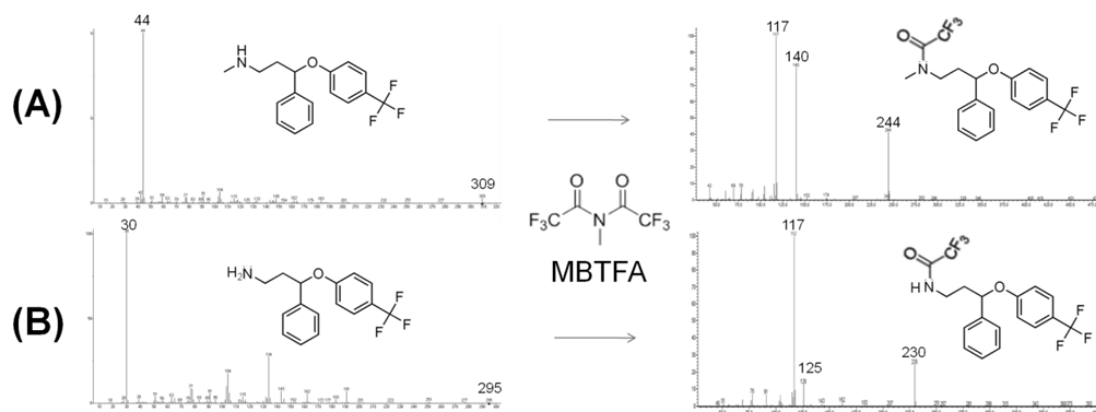


Figure 3. Structures and mass spectra of fluoxetine (A) and norfluoxetine (B) unchanged and derivatized with MBTFA.

3.2 Plasma protein precipitation

Protein precipitation was applied for sample clean-up, disrupting protein-drug binding, and avoiding precipitation during extraction [15]. Several effective protein precipitation techniques using either organic solvents, acids, or salt and metal ions have been reported [30]. Taking into account that organic solvents can withdraw the hollow fiber organic acceptor phase and that extraction pH of FLU and NOR is typically basic, which makes acids inappropriate agents, a 20% zinc sulfate (w/v) in 0.5 mol L⁻¹ NaOH solution was selected as precipitant. The use of this solution for plasma protein precipitation has already been described for other authors [29-32].

The figure 4 shows the effect of precipitant/plasma ratio in extraction efficiency.

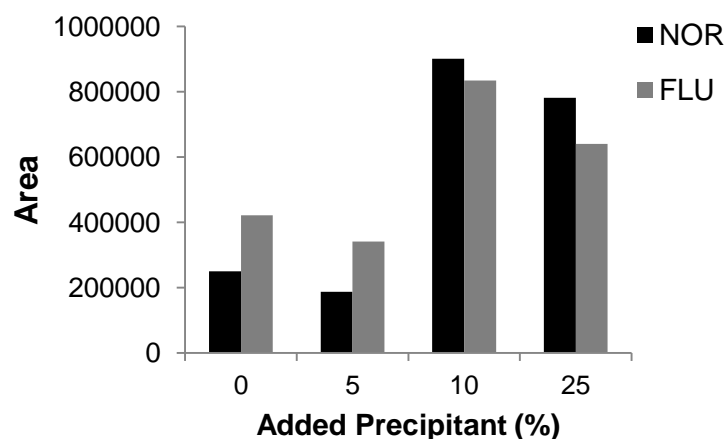


Figure 4. Precipitant addition effect on analytes LPME extraction.

3.3 LPME extraction optimization

3.3.1 Salt and pH

The salts addition in the matrix can increase the extraction efficiency, particularly for more polar analytes through salting-out effect. On the other hand, the interaction of the analyte molecules with added ions can reduce the spread of the analyte for the extraction phase [33]. Furthermore, the matrix viscosity increase can reduce the analytes mobility and also affect the extraction [34].

The salt influence was tested with addition of Na_2SO_4 (1g) in extraction solution (buffer 4.75 mL/plasma 0.25 mL). The salt addition decreased the amount extracted and hindered method precision. Therefore, salt was not used for the next experiments.

FLU and NOR are basic molecules with pKa of 10.05 and 9.05 respectively, and it is well known that the pH of donor solutions has an essential role in the extraction of basic drugs [22]. Analytes should be in their neutral form, making them extractable by the organic solvent in the fiber. Three pH values were studied: 8.0, 10.0 and 11.0 (Fig. 5). The pH of 11 (above analytes pKa) was optimal and, therefore, it was subsequently employed in later assays.

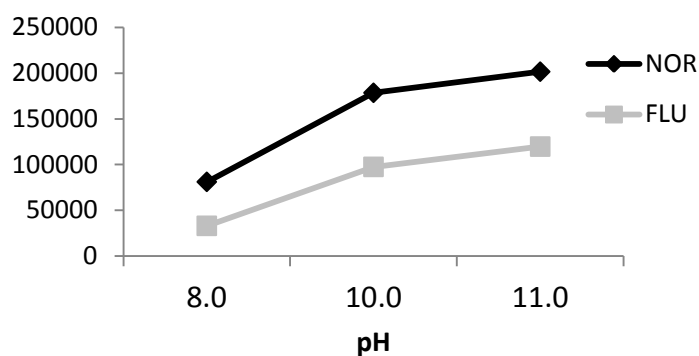


Figure 5. pH effect on NOR and FLU LPME extraction.

3.3.2 Thermodynamic parameters

A 2^{4-1} factorial design was performed to optimize the thermodynamic parameters that can affect LPME process (solvent type, buffer concentration, extraction solvent volume and proportion (sample:buffer)). The nominal values adopted in this study are presented on Table 1.

Table 1. Nominal values adopted in the thermodynamic variables study.

Variables	+1	-1
Solvent type	n-hexyl ether	1-octanol
Buffer solution concentration	0.5 mol L ⁻¹	0.1 mol L ⁻¹
Solvent volume	20 μ L	10 μ L
Proportion (sample:buffer)	1:5	1:20

Solvent type choice is a crucial parameter in LPME optimization. The final choice of the organic solvent should be based on several considerations. First, it should have a low solubility in water so that preventing dissolution into the aqueous phase; and a low volatility, which will restrict solvent evaporation during extraction [21]. When coupled to a GC, it should also have an excellent vaporization and chromatographic behavior [35].

As cited above, only two solvents, n-hexyl ether and 1-octanol, had been appropriated to IPD of FLU and NOR, so only these were tested as LPME solvent extraction.

The volumes of the donor and acceptor phases should be selected taking into account several considerations. In general, the sensitivity of the method can be increased by decreasing the volume ratio of the acceptor-to-donor phase [35]. However, the volume of the acceptor solution used for extraction may also be adjusted, depending on the analytical technique coupled to LPME [36]. For example, in GC auto sampler the volume should be enough for sampling. In our study, even with 50 μL polyspring inserts, the lower volume able to be analysis was 10 μL .

The proportion (sample:buffer) and buffer concentration were optimized in order to ensure maximum recovery of the analytes. Dilution of sample, commonly used in LPME plasma extractions [22, 37], favors the diffusion of analytes between sample and extractor phase, our study used a buffer for this dilution in order to simultaneously maintain the extraction pH. The buffer concentration, in addition to exercising a mild salting out, should be enough to keep stable the pH with plasma addition.

This type of design is often used as screening of significant variables, but in our case the 2^{4-1} factorial design was enough for the definition of optimal values to analysis. First, only two types of solvents were adequate and, therefore, tested; moreover the evaluated optimized values were limited by the following reasons: at concentrations less than 0.1 mol L^{-1} the buffer solution loses its buffering capacity, lower volumes than 10 μL are incompatible with the GC autosampler and the 1:5 ratio means in practice 1 mL of precipitate plasma, which is already a significant amount since it is required at least 5 mL of whole blood.

The optimized thermodynamic parameters were: 10 μL of n-hexyl ether and 1 ml of sample in 4 ml of phosphate buffer 0.1 mol/L as shows on Figure 6.

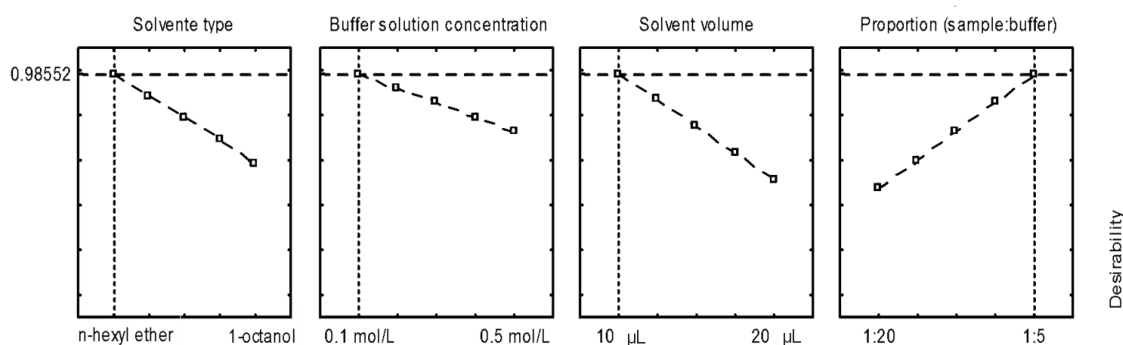


Figure 6. Profiles for predicted values and desirability to thermodynamic design.

3.3.3 Kinetic parameters

Stirring rate

Agitation of the sample is routinely applied to accelerate the extraction kinetics. Sample agitation, by using either orbital vibration or magnetic stirring, dramatically increased extraction, although, agitation by vibration eliminated the possibility of sample contamination through Teflon-coated magnetic stirrers [38].

Orbital shaking rates were evaluated at 600, 700, 800 and 1,000 rpm (Figure 7). The results indicate that extraction kinetics increased 700 rpm and at higher rates unexpectedly it decrease; this is because, at rates above this value, in the vortex the sample vibrates more than properly shakes, decreasing the sample:solvent interaction.

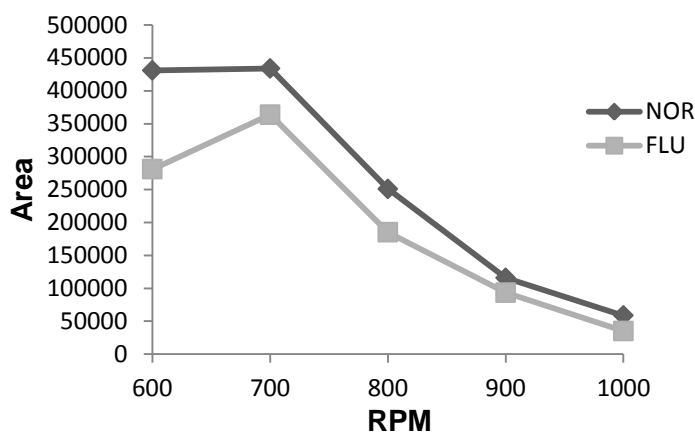


Figure 7. Effect of stirring rate on HF/LPME.

Extraction time

Mass-transfer is a time-dependent process, in some cases equilibrium is attained only after exposing the acceptor solution to the sample for a relatively long period of time [38].

Although longer exposure times of the acceptor solution generally result in increased extraction efficiency, it is not always practical to apply extended extraction times. In order to speed up the sample throughput some author adopted rapid LPME under non-equilibrium conditions, provided that validation data are unaffected by the extraction time [39].

Once the equilibrium time was not quickly achieved (Figure 8), the extraction was conducted under non-equilibrium conditions and time of 30 minutes was set for this method.

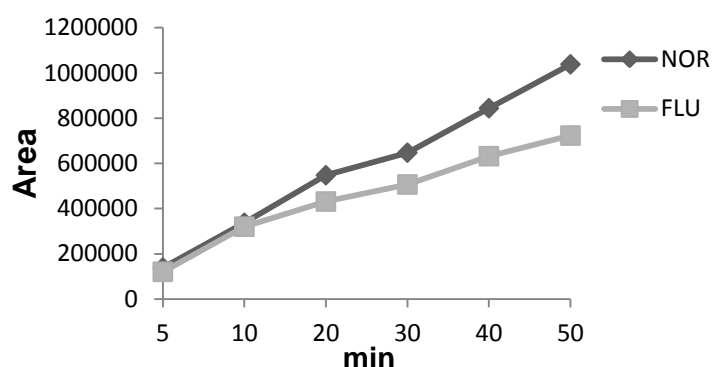


Figure 8. Extraction–time profile for NOR and FLU.

3.4 Method validation

3.4.1 Limits of detection and quantification

Limits of detection for FLU and NOR were established as the concentration where analyte peak was three times higher than the baseline noise ($S/N = 3$). LOD was 3 ng mL^{-1} for FLU and 5 ng mL^{-1} for NOR. LOQ ($S/N = 10$) were 10 ng mL^{-1} and 15 ng mL^{-1} for FLU and NOR respectively.

3.4.2 Linearity

Linearity was evaluated from LOQ to 500 ng mL^{-1} . Correlation coefficients were higher than 0.997 for FLU and NOR, demonstrating a linear correlation between the concentration and the response obtained. The linear regression equations obtained were: $y = -0.0683 + 0.0092x$ and $y = -0.2348 + 0.011x$ for FLU and NOR, respectively. Moreover, residual graphs did not show a non-linear pattern behavior for the data set.

3.4.3 Precision and accuracy

Precision and accuracy validation data are summarized in Table 2. These results demonstrate that the developed method has an adequate precision and accuracy.

Table 2. Precision and accuracy for the analysis of FLU and NOR in plasma samples.

Concentration (ng mL ⁻¹)	Precision ^a				Accuracy ^b	
	Intra-assay		Inter-assay		FLU	NOR
	FLU	NOR	FLU	NOR		
50	5.7	8.0	5.4	13.2	102.1	88.9
250	4.8	9.1	12.8	11.5	98.4	93.6
500	5.9	13.1	14.2	7.5	102.8	95.3

^a Expressed as coefficient of variation (CV %).

^b Expressed as deviation from theoretical values.

3.4.4 Stability and selectivity

In short term stability study, the analytes demonstrated to be stable in the acceptor phase at room temperature since after 10 h the deviation was between 85.9% and 108.2% compared to samples analyzed immediately after extraction. No interfering peaks from endogenous compounds (haemolyzed and lipaemic plasmas) were observed in the chromatogram. None of the drugs added to sample presented any peak eluting in the same retention time and m/z values of FLU, NOR and NTL.

3.4.5 Extraction efficiency

Extraction efficiency values obtained for the developed method are presented in Table 3. When compared with some other extraction techniques, these recovery values can be considered too low. However, been LPME a equilibrium technique and considering that extractions were performed in 30 min, when the equilibrium had not yet been achieved this values were acceptable. Besides that the method sensibility was appropriate to the type of analysis that is intended.

Table 3. Extraction efficiency obtained for FLU and NOR in plasma in three evaluated concentrations

Concentration (ng mL ⁻¹)	Extraction efficiency (%)	
	FLU	NOR
50	3.2	4.3
200	3.8	5.2
400	4.6	7.7

3.5 Application of the method

The optimized and validated method was employed to quantification of fluoxetine and norfluoxetine in 5 human patients treated with FLU. The results, expressed in ng mL^{-1} , are presented in Table 4 and in accordance with other studies of the literature [19, 22].

Table 4. Patient plasma concentration measured with the developed method.

Patient	FLU (ng mL^{-1})	NOR (ng mL^{-1})
1	28.8	77.9
2	105.1	66.7
3	129.2	130.9
4	39.4	66.0
5	24.3	48.7

4. Conclusion

The developed method is presented as an interesting tool for analysis of FLU and NOR. It is fast, sensible and environmentally friendly, significantly reducing both the use of solvents in sample preparation and separation. It is particularly interesting in laboratories not supplied with LC-MS/MS equipment and where the confidence of a mass spectrometric information can be easily accessed by a GC-MS instrument. The IPD with MBTFA, unpublished until the moment for the GC analysis of drugs, has been showing promising results and may be used as an alternative to HPLC analysis.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Mauricio Yonamine (Faculty of Pharmaceutical Sciences - University of São Paulo) for supplying LPME hollow fibers and CAPES for financial support, as well as the support of Membrana GmbH (Wuppertal, Germany).

References

- [1] A. Rossi, A. Barraco and P. Donda, Fluoxetine: a review on evidence based medicine, *Gen. Hosp. Psychiatry*, 3 (2004) 1-8.
- [2] S. Djordjevic, I. Kovacevic, B. Miljkovic, J. Vuksanovic and M. Pokrajac, Liquid chromatographic-mass spectrometric method for the determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma: application to clinical study, *Il Farmaco*, 60 (2005) 345-349.
- [3] P. Baumann, Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationship of the Selective Serotonin Reuptake Inhibitors, *Clin. Pharmacokinet.*, 31 (1996) 444-469.
- [4] C. Hiemke and S. Härtter, Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors, *Pharmacol. Ther.*, 85 (2000) 11-28.
- [5] A. J. Santos-Neto, J. C. Rodrigues, C. Fernandes, G. M. Titato, C. Alves and F. M. Lanças, Automated microcolumn-switching system for drug analysis by direct injection of human plasma, *J. Chromatogr. A*, 1105 (2006) 71-76.
- [6] S. Ulrich, Direct stereoselective assay of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma or serum by two-dimensional gas-liquid chromatography with nitrogen-phosphorus selective detection, *J. Chromatogr. B*, 783 (2003) 481-490.
- [7] M. Açikkol and D. Salkim, GC-MS analysis of fluoxetine and its active metabolite norfluoxetine in human urine, *Marmara Pharm. J.*, 14 (2010) 98-103.
- [8] E. Lacassie, J. M. Gaulier, P. Marquet, J. F. Rabatel and G. Lachâtre, Methods for the determination of seven selective serotonin reuptake inhibitors and three active metabolites in human serum using high-performance liquid chromatography and gas chromatography, *J. Chromatogr. B*, 742 (2000) 229-238.
- [9] P. Fontanille, N. Jourdil, C. Villier and G. Bessard, Direct analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection, *J. Chromatogr. B*, 692 (1997) 337-343.
- [10] G. Gatti, I. Bonomi, R. Marchiselli, C. Fattore, E. Spina, G. Scordo, R. Pacifici and E. Perucca, Improved enantioselective assay for the determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by liquid chromatography, *J. Chromatogr. B*, 784 (2003) 375-383.
- [11] T. W. Chow, A. s. Szeitz, D. W. Rurak and K. W. Riggs, A validated enantioselective assay for the simultaneous quantitation of (R)-, (S)-fluoxetine and (R)-, (S)-norfluoxetine in ovine plasma using liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS), *J. Chromatogr. B*, 879 (2011) 349-358.
- [12] J. J. B. Nevado, M. J. V. Llerena, C. G. Cabanillas and V. R. Robledo, Screening of citalopram, fluoxetine and their metabolites in human urine samples by gas chromatography-mass spectrometry: A global robustness/ruggedness study, *J. Chromatogr. A.*, 1123 (2006) 130-133.

- [13] C. Fernandes, A. J. d. S. Neto, J. C. Rodrigues, C. Alves and F. M. Lanças, Solid-phase microextraction-liquid chromatography (SPME-LC) determination of fluoxetine and norfluoxetine in plasma using a heated liquid flow through interface, *J. Chromatogr. B*, 847 (2007) 217-223.
- [14] C. Salgado-Petinal, J. P. Lamas, C. Garcia-Jares, M. Llompарт and R. Cela, Rapid screening of selective serotonin re-uptake inhibitors in urine samples using solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, 382 (2005) 1351-1359.
- [15] C. Fernandes, E. Van Hoeck, P. Sandra and F. M. Lanças, Determination of fluoxetine in plasma by gas chromatography-mass spectrometry using stir bar sorptive extraction, *Anal. Chim. Acta*, 614 (2008) 201-207.
- [16] D. F. de Freitas, C. E. D. Porto, E. P. Vieira and M. E. P. B. Siqueira, Three-phase, liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detection for the simultaneous determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 51 (2010) 170-177.
- [17] H. Trine Grønhaug, P.-B. Stig, J. L. E. Reubsaet and E. R. Knut, Liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry. Extraction from small volumes of biological samples, *J. Sep. Sci.*, 26 (2003) 1520-1526.
- [18] T. Vasskog, T. Anderssen, S. Pedersen-Bjergaard, R. Kallenborn and E. Jensen, Occurrence of selective serotonin reuptake inhibitors in sewage and receiving waters at Spitsbergen and in Norway, *J. Chromatogr. A*, 1185 (2008) 194-205.
- [19] A. J. Santos-Neto, C. Fernandes, J. C. Rodrigues, C. Alves and F. M. Lanças, Fluoxetine and norfluoxetine analysis by direct injection of human plasma in a column switching liquid chromatographic system, *J. Sep. Sci.*, 31 (2008) 78-85.
- [20] A. J. Santos-Neto, K. E. Markides, P. J. R. Sjöberg, J. Bergquist and F. M. Lancas, Capillary Column Switching Restricted-Access Media-Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry System for Simultaneous and Direct Analysis of Drugs in Biofluids, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 6359-6367.
- [21] S. Pedersen-Bjergaard and K. E. Rasmussen, Liquid Liquid Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 2650-2656.
- [22] D. F. de Freitas, C. E. D. Porto, E. P. Vieira and M. E. P. B. de Siqueira, Three-phase, liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detection for the simultaneous determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 51 (2010) 170-177.
- [23] N. Unceta, S. Barrondo, I. R. de Azúa, A. Gómez-Caballero, M. A. Goicolea, J. Sallés and R. J. Barrio, Determination of fluoxetine, norfluoxetine and their enantiomers in rat plasma and brain samples by liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. B*, 852 (2007) 519-528.

- [24] L. Xu, C. Basheer and H. K. Lee, Chemical reactions in liquid-phase microextraction, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 701-707.
- [25] L. Xu, M. Jiang and G. Li, Injection port derivatization following sonication-assisted ion-pair liquid-liquid extraction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Anal. Chim. Acta*, 666 (2010) 45-50.
- [26] K. E. Rasmussen, Quantitative morphine assay by means of gas-liquid chromatography and on-column silylation, *J. Chromatogr. A*, 120 (1976) 491-495.
- [27] K. S. Docherty and P. J. Ziemann, On-line, inlet-based trimethylsilyl derivatization for gas chromatography of mono- and dicarboxylic acids, *J. Chromatogr. A*, 921 (2001) 265-275.
- [28] I. A. Binsumait, K. A. Hadidi and S. Abu-Al Raghieb, Stability of fluoxetine in stored plasma, aqueous, and methanolic solutions determined by HPLC with UV detection, *Pharmazie*, 56 (2001) 311-313.
- [29] D. Humphries, K. Ruterbories, C. Chan and R. Narayanan, Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the determination of *α*-methyltyrosine in human plasma, *J. Chromatogr. B*, 810 (2004) 229-234.
- [30] C. Polson, P. Sarkar, B. Incledon, V. Raguvaran and R. Grant, Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 785 (2003) 263-275.
- [31] J. Hasselstom, Quantification of antidepressants and antipsychotics in human serum by precipitation and ultra high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 879 (2011) 123-128.
- [32] N. Mano, M. Sato, M. Nozawa, Y. Matsumoto, M. Mori, H. Yamaguchi, J. Goto and M. Shimada, An accurate quantitative LC/ESI - MS/MS method for sirolimus in human whole blood, *J. Chromatogr. B*, 879 (2011) 987-992.
- [33] G. Shen and H. K. Lee, Hollow Fiber-Protected Liquid-Phase Microextraction of Triazine Herbicides, *Anal. Chem.*, 74 (2001) 648-654.
- [34] H. G. Uglund, M. Krogh and K. E. Rasmussen, Liquid-phase microextraction as a sample preparation technique prior to capillary gas chromatographic-determination of benzodiazepines in biological matrices, *J. Chromatogr. B*, 749 (2000) 85-92.
- [35] G. Shen and H. K. Lee, Hollow Fiber-Protected Liquid-Phase Microextraction of Triazine Herbicides, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 648-654.
- [36] K. E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, M. Krogh, H. Grefslie Uglund and T. Grønhaug, Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 873 (2000) 3-11.

[37] I. d. S. Magalhães and P. S. Bonato, Two-step liquid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography for the simultaneous analysis of the enantiomers of mefloquine and its main metabolite carboxymefloquine in plasma, *Anal. Bioanal. Chem.*, 393 (2009) 1805-1813.

[38] E. Psillakis and N. Kalogerakis, Developments in liquid-phase microextraction, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 22 (2003) 565-574.

[39] T. S. Ho, S. Pedersen-Bjergaard and K. E. Rasmussen, Liquid-phase microextraction of protein-bound drugs under non-equilibrium conditions, *Analyst*, 127 (2002) 608 - 613.

REFERÊNCIAS

Açikkol, M., Salkim, D. *GC-MS analysis of fluoxetine and its active metabolite norfluoxetine in human urine*. **Marmara Pharm. J.**, v. 14, p. 98-103, 2010.

Alves, C. (2006). Análise de fármacos em flúidos biológicos empregando o acoplamento SPME-LC/MS. Instituto de Química de São Carlos. São Carlos, USP. **Tese (Doutorado em Ciências):** 199.

Amsterdam, J. D., Fawcett, J., Quitkin, F. M., Reimherr, F. W., Rosenbaum, J. F., Michelson, D., Hornig-Rohan, M., Beasley, C. M. *Fluoxetine and norfluoxetine plasma concentrations in major depression: a multicenter study*. **Am. J. Psychiatry**, v. 154, p. 963-969, 1997.

Anderson, I. M., Tomenson, B. M. *Treatment discontinuation with selective serotonin reuptake inhibitors compared with tricyclic antidepressants: a meta-analysis*. **Br. Med. J.**, v. 310, p. 1433-1438, 1995.

Bai-Juan, Y., Feng-Hua, J., Xiao-Qin, X., Jun-Hui, C., Lee, F. S. C. *Determination of Alkylphenols in Water by Solid-Phase Extraction with On-column Derivatization Coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. **Chinese J. Anal. Chem.**, v. 35, p. 633-637, 2007.

Basheer, C., Lee, H. K. *Analysis of endocrine disrupting alkylphenols, chlorophenols and bisphenol-A using hollow fiber-protected liquid-phase microextraction coupled with injection port-derivatization gas chromatography-mass spectrometry*. **J. Chromatogr. A**, v. 1057, p. 163-169, 2004.

Baumann, P., Rochat, B. *Comparative pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors: A look behind the mirror*. **Int. Clin. Psychopharmacol.**, v. 10, p. 15 - 21, 1995.

Bezerra, M. d. A. (2003). Aplicação de matriz de Doehlert na otimização de um sistema de pré-concentração em linha para determinação de cobre usando Espectrometria de absorção atômica com chama. Campus Universitário de Ondina. Salvador, Universidade Federal da Bahia. **Dissertação (Mestrado em Ciências - Química):** 95.

Bosque-Sendra, J. M., Nechar, M., Rodríguez, L. C., Molina, M. F. M. *Optimization of analytical methods by using Doehlert's designs*. **Anal. Proc.**, v. 32, p. 375-377, 1995.

Catterson, M. L., Preskorn, S. H. *Pharmacokinetics of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors: Clinical Relevance*. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 78, p. 203-208, 1996.

Charlier, C., Broly, F., Lhermitte M., Pinto E., Anseau, M., Plomteux G. *Polymorphisms in the CYP 2D6 Gene: Association with Plasma Concentrations of Fluoxetine and Paroxetine.* **Ther. Drug Monit.**, v. 25, p. 738-742, 2003.

Chiang, J. S., Huang, S. D. *Simultaneous derivatization and extraction of amphetamine and methylenedioxyamphetamine in urine with headspace liquid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry.* **J. Chromatogr. A**, v. 1185, p. 19-22, 2008.

Chow, T. W., Szeitz, A. s., Rurak, D. W., Riggs, K. W. *A validated enantioselective assay for the simultaneous quantitation of (R)-, (S)-fluoxetine and (R)-, (S)-norfluoxetine in ovine plasma using liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS).* **J. Chromatogr. B**, v. 879, p. 349-358, 2011.

Christophersen, A. S., Hovland, E., Rasmussen, K. E. *Glass capillary column gas chromatography of phenol-alkylamines after flash-heater derivatization using a double injection technique.* **J. Chromatogr. A**, v. 234, p. 107-120, 1982.

Cordero, R., Paterson, S. *Simultaneous quantification of opiates, amphetamines, cocaine and metabolites and diazepam and metabolite in a single hair sample using GC-MS.* **J. Chromatogr. B**, v. 850, p. 423-431, 2007.

Cortada, C., Vidal, L., Pastor, R., Santiago, N., Canals, A. *Determination of organochlorine pesticides in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry.* **Anal. Chim. Acta**, v. 649, p. 218-221, 2009.

Cui, S., Tan, S., Ouyang, G., Pawliszyn, J. *Automated polyvinylidene difluoride hollow fiber liquid-phase microextraction of flunitrazepam in plasma and urine samples for gas chromatography/tandem mass spectrometry.* **J. Chromatogr. A**, v. 1216, p. 2241-2247, 2009.

Daniel, W. A., Wojcikowski, J. *Interactions between promazine and antidepressants at the level of cellular distribution.* **Pharmacol. Toxicol.**, v. 81, p. 259-264, 1997.

de Freitas, D. F., Porto, C. E. D., Vieira, E. P., Siqueira, M. E. P. B. *Three-phase, liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detection for the simultaneous determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma.* **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 51, p. 170-177, 2010.

Delmar Cantú, M., Hillebrand, S., Costa Queiroz, M. E., 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**, v. 799, p. 127-132, 2004.

Djordjevic, S., Kovacevic, I., Miljkovic, B., Vuksanovic, J., Pokrajac, M. *Liquid chromatographic-mass spectrometric method for the determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma: application to clinical study.* **Il Farmaco**, v. 60, p. 345-349, 2005.

Docherty, K. S., Ziemann, P. J. *On-line, inlet-based trimethylsilyl derivatization for gas chromatography of mono- and dicarboxylic acids.* **J. Chromatogr. A**, v. 921, p. 265-275, 2001.

Eap, C. B., Gaillard, N., Powell, K., Baumann, P. *Simultaneous determination of plasma levels of fluvoxamine and of the enantiomers of fluoxetine and norfluoxetine by gas chromatography-mass spectrometry.* **J. Chromatogr. B**, v. 682, p. 265-272, 1996.

Es'haghi, Z. *Determination of widely used non-steroidal anti-inflammatory drugs in water samples by in situ derivatization, continuous hollow fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography-flame ionization detector.* **Anal. Chim. Acta**, v. 641, p. 83-88, 2009.

Fava, M., Rappe, S. M., Pava, J. A., Nierenberg, A. A., Alpert, J. E., Rosenbaum, J. F. *Relapse in patients on long-term fluoxetine treatment: response to increased fluoxetine dose.* **J. Clin. Psychiatry**, v. 56, p. 52-55, 1995.

Fernandes, C., Neto, A. J. d. S., Rodrigues, J. C., Alves, C., Lanças, F. M. *Solid-phase microextraction-liquid chromatography (SPME-LC) determination of fluoxetine and norfluoxetine in plasma using a heated liquid flow through interface.* **J. Chromatogr. B**, v. 847, p. 217-223, 2007.

Fernandes, C., Van Hoeck, E., Sandra, P., Lanças, F. M. *Determination of fluoxetine in plasma by gas chromatography-mass spectrometry using stir bar sorptive extraction.* **Anal. Chim. Acta**, v. 614, p. 201-207, 2008.

Fontanille, P., Jourdil, N., Villier, C., Bessard, G. *Direct analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection.* **J. Chromatogr. B**, v. 692, p. 337-343, 1997.

Gatti, G., Bonomi, I., Marchiselli, R., Fattore, C., Spina, E., Scordo, G., Pacifici, R., Perucca, E. *Improved enantioselective assay for the determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by liquid chromatography.* **J. Chromatogr. B**, v. 784, p. 375-383, 2003.

Ghambarian, M., Yamini, Y., Esrafil, A. *Three-phase hollow fiber liquid-phase microextraction based on two immiscible organic solvents for determination of tramadol in urine and plasma samples.* **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 56, p. 1041-1045, 2011.

Gram, L. F. *Fluoxetine.* **N. Engl. J. Med.**, v. 331, p. 1354-1361, 1994.

Hidvégi, E., Fábrián, P., Hideg, Z., Somogyi, G. *GC-MS determination of amphetamines in serum using on-line trifluoroacetylation.* **Forensic Sci. Int.**, v. 161, p. 119-123, 2006.

Hiemke, C., Härtter, S. *Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors.* **Pharmacol. Ther.**, v. 85, p. 11-28, 2000.

Ho, T. S., Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E. *Liquid-phase microextraction of protein-bound drugs under non-equilibrium conditions.* **Analyst**, v. 127, p. 608 - 613, 2002.

Hou, L., Shen, G., Lee, H. K. *Automated hollow fiber-protected dynamic liquid-phase microextraction of pesticides for gas chromatography-mass spectrometric analysis.* **J. Chromatogr. A**, v. 985, p. 107-116, 2003.

Huang, M.-K., Liu, C., Li, J.-H., Huang, S.-D. *Quantitative detection of ketamine, norketamine, and dehydronorketamine in urine using chemical derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry.* **J. Chromatogr. B**, v. 820, p. 165-173, 2005.

Iida, T., Ogawa, S., Kakiyama, G., Goto, T., Mano, N., Goto, J., Nambara, T. *Capillary gas chromatographic separation of bile acid acyl glycosides without thermal decomposition and isomerization.* **J. Chromatogr. A**, v. 1057, p. 171-176, 2004.

Jeannot, M. A., Cantwell, F. F. *Solvent Microextraction into a Single Drop.* **Anal. Chem.**, v. 68, p. 2236-2240, 1996.

Jeannot, M. A., Cantwell, F. F. *Mass Transfer Characteristics of Solvent Extraction into a Single Drop at the Tip of a Syringe Needle.* **Anal. Chem.**, v. 69, p. 235-239, 1997.

Kataoka, H. *Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis.* **J. Chromatogr. A**, v. 733, p. 19-34, 1996.

Katzung, B. G. (2006). Farmacologia: básica e clínica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Kecskeméti, V. i., Rusznák, Z., Riba, P., Pál, B., Wagner, R., Harasztosi, C., Nánási, P. P., Szûcs, G. *Norfluoxetine and fluoxetine have similar anticonvulsant and Ca²⁺ channel blocking potencies.* **Brain Res. Bull.**, v. 67, p. 126-132, 2005.

Kubwabo, C., Stewart, B., Gauthier, S. A., Gauthier, B. R. *Improved derivatization technique for gas chromatography-mass spectrometry determination of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone in drinking water.* **Anal. Chim. Acta**, v. 649, p. 222-229, 2009.

Lacassie, E., Gaulier, J. M., Marquet, P., Rabatel, J. F., Lachâtre, G. *Methods for the determination of seven selective serotonin reuptake inhibitors and three active metabolites in human serum using high-performance liquid chromatography and gas chromatography.* **J. Chromatogr. B**, v. 742, p. 229-238, 2000.

Leinonen, A., Vuorensola, K., Lepola, L.-M., Kuuranne, T., Kotiaho, T., Ketola, R. A., Kostiaainen, R. *Liquid-phase microextraction for sample preparation in analysis of unconjugated anabolic steroids in urine.* **Anal. Chim. Acta**, v. 559, p. 166-172, 2006.

Liu, H., Dasgupta, P. K. *Analytical Chemistry in a Drop. Solvent Extraction in a Microdrop.* **Anal. Chem.**, v. 68, p. 1817-1821, 1996.

Liu, W., Zhang, L., Wei, Z., Chen, S., Chen, G. *Analysis of beta-agonists and beta-blockers in urine using hollow fibre-protected liquid-phase microextraction with in situ derivatization followed by gas chromatography/mass spectrometry.* **J. Chromatogr. A**, v. 1216, p. 5340-5346, 2009.

Maddox, J. C., Levi, M., Thompson, C. *The compliance with antidepressants in general practice.* v. 8, p. 48-52, 1994.

Magalhães, I. d. S., Bonato, P. S. *Two-step liquid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography for the simultaneous analysis of the enantiomers of mefloquine and its main metabolite carboxymefloquine in plasma.* **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 393, p. 1805-1813, 2009.

Matsui, E., Hoshino, M., Matsui, A., Okahira, A. *Simultaneous determination of citalopram and its metabolites by high-performance liquid chromatography with column switching and fluorescence detection by direct plasma injection.* **J. Chromatogr. B**, v. 668, p. 299-307, 1995.

Miki, A., Katagi, M., Zaitso, K., Nishioka, H., Tsuchihashi, H. *Development of a two-step injector for GC-MS with on-column derivatization, and its application to the determination of*

amphetamine-type stimulants (ATS) in biological specimens. J. Chromatogr. B, v. 865, p. 25-32, 2008.

Müller, S., Möder, M., Schrader, S., Popp, P. *Semi-automated hollow-fibre membrane extraction, a novel enrichment technique for the determination of biologically active compounds in water samples. J. Chromatogr. A*, v. 985, p. 99-106, 2003.

Myung, S. W., Jo, C. H. *Gas chromatograph-mass spectrometric method for the determination of carvedilol and its metabolites in human urine. J. Chromatogr. B*, v. 822, p. 70-77, 2005.

Neto, B. B., Scarmínio, I. S., Bruns, R. E. (1996). Planejamento e otimização de experimentos. Campinas, Unicamp.

Nevado, J. J. B., Llerena, M. J. V., Cabanillas, C. G., Robledo, V. R. *Screening of citalopram, fluoxetine and their metabolites in human urine samples by gas chromatography-mass spectrometry: A global robustness/ruggedness study. J. Chromatogr. A*, v. 1123, p. 130-133, 2006.

Nevado, J. J. B., Llerena, M. J. V., Salcedo, A. M. C., Nuevo, E. A. *Assay validation for three antidepressants in pharmaceutical formulations: Practical approach using capillary gas chromatography. J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 38, p. 52-59, 2005.

Oliveira, A. R. M. d., Magalhães, I. R. d. S., Santana, F. J. M. d., Bonato, P. S. *Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. Quim. Nova*, v. 31, p. 637-644, 2008.

Ouyang, G., Zhao, W., Pawliszyn, J. *Automation and optimization of liquid-phase microextraction by gas chromatography. J. Chromatogr. A*, v. 1138, p. 47-54, 2007.

Pablo Lamas, J., Salgado-Petinal, C., García-Jares, C., Llompарт, M., Cela, R., Gómez, M. *Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of selective serotonin reuptake inhibitors in environmental water. J. Chromatogr. A*, v. 1046, p. 241-247, 2004.

Pedersen-Bjergaard, S., Ho, T. S., Rasmussen, K. E. *Fundamental studies on selectivity in 3-phase liquid-phase microextraction (LPME) of basic drugs. J. Sep. Sci.*, v. 25, p. 141-146, 2002.

Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E. *Liquid Liquid Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis*. **Anal. Chem.**, v. 71, p. 2650-2656, 1999.

Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E. *Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques*. **J. Chromatogr. B**, v. 817, p. 3-12, 2005.

Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E. *Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction*. **J. Chromatogr. A**, v. 1184, p. 132-142, 2008.

Prieto, A., Vallejo, A., Zuloaga, O., Paschke, A., Sellergen, B., Schillinger, E., Schrader, S., Möder, M. *Selective determination of estrogenic compounds in water by microextraction by packed sorbents and a molecularly imprinted polymer coupled with large volume injection-in-port-derivatization gas chromatography-mass spectrometry*. **Anal. Chim. Acta**, v. 703, p. 41-51, 2011.

Psillakis, E., Kalogerakis, N. *Developments in liquid-phase microextraction*. **TrAC, Trends Anal. Chem.**, v. 22, p. 565-574, 2003.

Ramaiya, A., March, C., Thomas Karnes, H. *Single pump column switching technique employing a flow gradient and wavelength programmed fluorescence for simultaneous monitoring of serotonin, fluoxetine and norfluoxetine in rat brain microdialysate*. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 15, p. 729-738, 1997.

Rasmussen, K. E. *Quantitative morphine assay by means of gas-liquid chromatography and on-column silylation*. **J. Chromatogr. A**, v. 120, p. 491-495, 1976.

Rasmussen, K. E., Pedersen-Bjergaard, S. *Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction*. **TrAC, Trends Anal. Chem.**, v. 23, p. 1-10, 2004.

Rasmussen, K. E., Pedersen-Bjergaard, S., Krogh, M., Grefslie Ugland, H., Grønhaug, T. *Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography*. **J. Chromatogr. A**, v. 873, p. 3-11, 2000.

Rossi, A., Barraco, A., Donda, P. *Fluoxetine: a review on evidence based medicine*. **Gen. Hosp. Psychiatry**, v. 3, p. 1-8, 2004.

Saleh, A., Yamini, Y., Faraji, M., Shariati, S., Rezaee, M. *Hollow fiber liquid phase microextraction followed by high performance liquid chromatography for determination of ultra-trace levels of Se(IV) after derivatization in urine, plasma and natural water samples.* **J. Chromatogr. B**, v. 877, p. 1758-1764, 2009.

Salgado-Petinal, C., Lamas, J. P., Garcia-Jares, C., Llompert, M., Cela, R. *Rapid screening of selective serotonin re-uptake inhibitors in urine samples using solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry.* **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 382, p. 1351-1359, 2005.

Santos Neto, A. J., Rodrigues, J. C., Fernandes, C., Titato, G. M., Alves, C., Lanças, F. M. *Automated microcolumn-switching system for drug analysis by direct injection of human plasma.* **J. Chromatogr. A**, v. 1105, p. 71-76, 2006.

Sarafraz-Yazdi A., Amiri A. *Liquid-phase microextraction.* **TrAC, Trends Anal Chem**, v. 29, p. 1-14, 2010.

Sardela, V. F., Motta, M. T. R., Padilha, M. C., Pereira, H. M. G., Neto, F. R. A. *Analysis of sibutramine metabolites as N-trifluoroacetamide and O-trimethylsilyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry in urine.* **J. Chromatogr. B**, v. 877, p. 3003-3011, 2009.

Shen, G., Lee, H. K. *Hollow Fiber-Protected Liquid-Phase Microextraction of Triazine Herbicides.* **Anal. Chem.**, v. 74, p. 648-654, 2001.

Silva, P. (2006). Farmacologia. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Spyridaki, M.-H. E., Tsitsimpikou, C. J., Siskos, P. A., Georgakopoulos, C. G. *Determination of ephedrine in urine by gas chromatography-mass spectrometry.* **J. Chromatogr. B**, v. 758, p. 311-314, 2001.

Stalikas, C., Fiamegos, Y., Sakkas, V., Albanis, T. *Developments on chemometric approaches to optimize and evaluate microextraction.* **J. Chromatogr. A**, v. 1216, p. 175-189, 2009.

Strauss, W. L., Layton, M. E., Hayes, C. E., Dager, S. R. *¹⁹F magnetic resonance spectroscopy investigation in vivo of acute and steady-state brain fluvoxamine levels in obsessive-compulsive disorder.* **Am. J. Psychiatry**, v. 154, p. 516-522, 1997.

Tahmasebi, E., Yamini, Y., Saleh, A. *Extraction of trace amounts of pioglitazone as an anti-diabetic drug with hollow fiber liquid phase microextraction and determination by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection in biological fluids.* **J. Chromatogr. B**, v. 877, p. 1923-1929, 2009.

Trine Grønhaug, H., Stig, P.-B., Reubsæet, J. L. E., Knut, E. R. *Liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry. Extraction from small volumes of biological samples.* **J. Sep. Sci.**, v. 26, p. 1520-1526, 2003.

Tzing, S.-H., Ding, W.-H. *Determination of melamine and cyanuric acid in powdered milk using injection-port derivatization and gas chromatography-tandem mass spectrometry with furan chemical ionization.* **J. Chromatogr. A**, v. 1217, p. 6267-6273, 2010.

Ugland, H. G., Krogh, M., Rasmussen, K. E. *Liquid-phase microextraction as a sample preparation technique prior to capillary gas chromatographic-determination of benzodiazepines in biological matrices.* **J. Chromatogr. B**, v. 749, p. 85-92, 2000.

Ulrich, S. *Direct stereoselective assay of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma or serum by two-dimensional gas-liquid chromatography with nitrogen-phosphorus selective detection.* **J. Chromatogr. B**, v. 783, p. 481-490, 2003.

Unceta, N., Barrondo, S., de Azúa, I. R., Gómez-Caballero, A., Goicolea, M. A., Sallés, J., Barrio, R. J. *Determination of fluoxetine, norfluoxetine and their enantiomers in rat plasma and brain samples by liquid chromatography with fluorescence detection.* **J. Chromatogr. B**, v. 852, p. 519-528, 2007.

Unceta, N., Gómez-Caballero, A., Sánchez, A., Millán, S., Sampedro, M. C., Goicolea, M. A., Sallés, J., Barrio, R. J. *Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine and their main metabolites in human urine samples by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography.* **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 46, p. 763-770, 2008.

Varanusupakul, P., Vora-adisak, N., Pulpoka, B. *In situ derivatization and hollow fiber membrane microextraction for gas chromatographic determination of haloacetic acids in water.* **Anal. Chim. Acta**, v. 598, p. 82-86, 2007.

Vasskog, T., Anderssen, T., Pedersen-Bjergaard, S., Kallenborn, R., Jensen, E. *Occurrence of selective serotonin reuptake inhibitors in sewage and receiving waters at Spitsbergen and in Norway.* **J. Chromatogr. A**, v. 1185, p. 194-205, 2008.

Vaswani, M., Linda, F. K., Ramesh, S. *Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review.* **Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 27, p. 85-102, 2003.

Wille, S. M. R., Maudens, K. E., Van Peteghem, C. H., Lambert, W. E. E. *Development of a solid phase extraction for 13 "new" generation antidepressants and their active metabolites*

for gas chromatographic-mass spectrometric analysis. **J. Chromatogr. A**, v. 1098, p. 19-29, 2005.

Wong, D. T., Bymaster, F. P., Engleman, E. A. *Prozac (fluoxetine, lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication.* **Life Sci**, v. 57, p. 411-441, 1995.

Wu, J., Hu, R., Yue, J., Yang, Z., Zhang, L. *Determination of fecal sterols by gas chromatography-mass spectrometry with solid-phase extraction and injection-port derivatization.* **J. Chromatogr. A**, v. 1216, p. 1053-1058, 2009.

Wu, J., Lee, H. K. *Orthogonal array designs for the optimization of liquid-liquid-liquid microextraction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs combined with high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection.* **J. Chromatogr. A**, v. 1092, p. 182-190, 2005.

Xiao, Q., Hu, B. *Hollow fiber-liquid phase microextraction combined with gas chromatography for the determination of phenothiazine drugs in urine.* **J. Chromatogr. B**, v. 878, p. 1599-1604, 2010.

Xiong, J., Chen, J., He, M., Hu, B. *Simultaneous quantification of amphetamines, caffeine and ketamine in urine by hollow fiber liquid phase microextraction combined with gas chromatography-flame ionization detector.* **Talanta**, v. In Press, Corrected Proof, p. 2010.

Xu, L., Basheer, C., Lee, H. K. *Chemical reactions in liquid-phase microextraction.* **J. Chromatogr. A**, v. 1216, p. 701-707, 2009.

Xu, L., Jiang, M., Li, G. *Injection port derivatization following sonication-assisted ion-pair liquid-liquid extraction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs.* **Anal. Chim. Acta**, v. 666, p. 45-50, 2010.

Zhang, J., Lee, H. K. *Application of liquid-phase microextraction and on-column derivatization combined with gas chromatography-mass spectrometry to the determination of carbamate pesticides.* **J. Chromatogr. A**, v. 1117, p. 31-37, 2006.

Zhang, J., Lee, H. K. *Application of dynamic liquid-phase microextraction and injection port derivatization combined with gas chromatography-mass spectrometry to the determination of acidic pharmaceutically active compounds in water samples.* **J. Chromatogr. A**, v. 1216, p. 7527-7532, 2009.

Zorita, S., Hallgren, P., Mathiasson, L. Steroid hormone determination in water using an environmentally friendly membrane based extraction technique. *J. Chromatogr. A*, v. 1192, p. 1-8, 2008.