

DANIELA FERNANDA DE FREITAS

**MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA NO
PREPARO DE AMOSTRA DE PLASMA PARA
ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE
FLUOXETINA E NORFLUOXETINA**

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

Orientadora: Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira.

**Alfenas/MG
2009**

DANIELA FERNANDA DE FREITAS

**MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA NO PREPARO DE
AMOSTRA DE PLASMA PARA ANÁLISE
CROMATOGRÁFICA DE FLUOXETINA E NORFLUOXETINA**

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

Aprovada em:

Prof^ª. Dr^ª. Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Prof^ª. Dr^ª. Pierina Sueli Bonato

Instituição: Universidade de São Paulo

Assinatura:

Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, **Joaquim Loiola e Maria Aparecida**, pelo carinho, amizade, confiança e incentivo, mesmo que a distância (sempre presentes em meu coração). Exemplos de coragem, perseverança e conquista, para mim, exemplos de vida.

Ao meu amado esposo **Rafael**, pelo companheirismo, amizade, paciência e compreensão. O seu apoio e estímulo foram essenciais para realização desta nossa conquista.

Ao meu querido filho **Cauã**, que sendo tão pequeno compreendeu a minha ausência e me inspirou a acreditar em um mundo melhor.

Aos meus irmãos **Diarone, Deborah, Denarte, Duílio**, a **Cristina** (cunhada) e **Maria Isabel** (sobrinha) pelo apoio e amizade oferecidos, cada um a sua maneira, durante toda essa jornada.

À minha segunda família: **Bata, Catarina** (sogros), **Daniel, Juninho**, (cunhados), e **Marcelo** (minha babá quase perfeita), pelo apoio e torcida, e por me darem a tranquilidade necessária para a realização deste trabalho ao cuidarem com tanto carinho do meu filho Cauã.

A toda a minha **família e amigos** que sempre torceram por mim incondicionalmente.

À Professora Doutora **Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira** que com altruísmo compartilhou não só o seu conhecimento científico, mas, dedicação, compreensão, carinho e otimismo. Seus ensinamentos foram fundamentais para esta grande conquista.

A todos do **Laboratório de Análises Toxicológicas** da Unifal-MG que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. A vocês ofereço as seguintes palavras:

"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis..."

(Fernando Pessoa).

Agradeço especialmente a **Deus**, pelo dom da vida, sabedoria, e perseverança, pois, sem estes jamais poderia estar concretizando esta conquista.

"Deus é minha fortaleza e a minha força e ele perfeitamente desembaraça o meu caminho".

2 Samuel 22:33

AGRADECIMENTOS

À Unifal-MG, pela oportunidade oferecida para obtenção deste título.

Aos coordenadores e secretário do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Unifal-MG pela dedicação ao curso e atenção recebida sempre que solicitada.

À "família" do Laboratório de Análises Toxicológicas da Unifal-MG: Isarita, Fábio, Márcia e Andressa, que de alguma forma contribuíram para este trabalho. Em especial, à Patrícia e à Beth pelo auxílio nos equipamentos, e também pela amizade em todos os momentos.

À Professora Doutora Pierina Sueli Bonato da FCF/USP/Ribeirão Preto, por ter cedido gentilmente as fibras de polipropileno e o padrão de norfluoxetina, materiais essenciais nesta pesquisa. Também por disponibilizar o estágio no laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar (CROEC) e pelas sugestões feitas durante a execução deste trabalho. E ao FERNANDO, IGOR e PATRÍCIA, pós-graduandos do CROEC, pelos ensinamentos no laboratório.

Aos Professores Doutores Maurício Yonamine (FCF/USP/SP), José Luiz da Costa (IC/SP), Álvaro José dos Santos Neto (Unifal-MG) e Gislaine Ribeiro Pereira (Unifal-MG), por terem prontamente cedido materiais que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas da Pós-Graduação, pela troca de conhecimentos, pela amizade e companheirismo. Em especial, Betânia, Adélia e Lusiane.

Aos colegas de laboratório, pela amizade e convivência. Aprendi muito com cada um de vocês.

Ao aluno de iniciação científica Carlos Eduardo, pelo auxílio e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

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

RESUMO

Os antidepressivos são fármacos para os quais é de interesse realizar análises em material biológico com finalidades diversas. Entre eles, destacam-se a fluoxetina (FLU) e seu metabólito ativo, a norfluoxetina (NORFLU). Novas tendências para a miniaturização do processo de preparo de amostras biológicas têm sido apontadas no sentido de se usar técnicas que consomem menor quantidade de solventes orgânicos, entre elas, a microextração em fase líquida (LPME). Portanto, o presente trabalho teve por finalidade o desenvolvimento de método de microextração em fase líquida como técnica de preparo de amostra de plasma para análise por cromatografia líquida de alta eficiência da fluoxetina e norfluoxetina. Empregando-se uma coluna de fase reversa Select B (125 mm x 4 mm x 5 µm) com fase móvel tampão acetato de sódio 0,005 mol L⁻¹ pH 4,5: acetonitrila (50:50, v/v), na vazão de 0,6 mL min⁻¹ e utilizando o detector por fluorescência nos comprimentos de onda de excitação de 230 nm e de emissão de 290 nm, obteve-se resolução e eficiência cromatográfica satisfatórias para os analitos. A LPME foi conduzida em fibra oca de polipropileno de 7 cm, usando-se 1 mL de plasma, éter *n*-hexílico como solvente extrator e ácido clorídrico 20 mmol L⁻¹ como solução aceptora, em um sistema de três fases. Após a otimização das variáveis da LPME (solvente extrator, tempo de extração, velocidade de agitação, tipo e pH da solução aceptora, pH da solução da amostra, uso de sal e de solvente orgânico na fase doadora), o método foi validado. A linearidade foi estabelecida no intervalo de 5 a 500 ng mL⁻¹ de FLU e NORFLU, com coeficientes de determinação (R²) de 0,9999 e de 0,9962. Os valores médios de recuperação relativa foram de 70,9 e 59,7 % para FLU e a NORFLU respectivamente. A precisão e a exatidão foram avaliadas para 3 concentrações dos analitos (20, 80 e 160 ng mL⁻¹) e os coeficientes de variação encontrados foram inferiores a 13,0 %; a exatidão foi satisfatória. O método de análise de FLU e NORFLU em plasma por LPME e cromatografia líquida de alta eficiência com detector por fluorescência, e usando a venlafaxina como padrão interno, resultou em excelente limpeza da amostra e elevada seletividade, sendo simples, econômico, relativamente rápido, e a técnica de extração permite o pré-enriquecimento dos analitos. O método foi aplicado com sucesso na análise de

amostras de 12 pacientes em uso de fluoxetina e demonstrou sua viabilidade para uso em análises rotineiras de monitorização terapêutica.

Palavras-chave: Microextração em fase líquida. Cromatografia líquida de alta eficiência. Fluoxetina. Norfluoxetina. Plasma.

ABSTRACT

Antidepressants, such as fluoxetine (FLU) and its active metabolite norfluoxetine (NORFLU), are drugs for which the analysis in biological fluids is of high interest in various areas of application. New trends in the miniaturization of sample pre-treatment techniques have been identified in order to use methods that consume less quantity of organic solvents, among them, liquid-phase microextraction (LPME). Therefore, the aim of this work was to develop and validate an analytical method using high performance liquid chromatography coupled to LPME for the analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma samples. The use of a reverse phase Select B column (125 mm x 4 mm x 5 μ m) 0.005 mol L⁻¹ sodium acetate buffer, pH 4.5: acetonitrile (50:50, v/v) as mobile phase at flow rate of 0.6 mL min⁻¹, and a fluorescence detector at wavelengths of excitation at 230 nm and emission at 290 nm, resulted in satisfactory chromatographic resolution and efficiency for the analytes. Three-phase LPME system using a disposable 7-cm polypropylene porous hollow fiber, 1 mL of plasma, *n*-hexyl ether (extractor solution) and 20 mmol L⁻¹ hydrochloric acid (acceptor solution) were used in the extraction. After optimization of several parameters influencing LPME efficiency (organic extraction solvent, extraction time, stirring speed, type and pH of acceptor solution, pH of sample solution, use of salt and organic solvent in the donor phase) the method was validated. Linearity over a 5 – 500 ng mL⁻¹ range with determination coefficients (R^2) of 0.9999 and 0.9962, respectively for FLU and NORFLU were established. Extraction recovery from plasma samples were 70.9 % for FLU and 59.7 % for NORFLU. The intra-assay and inter-assay precision and accuracy were studied for three concentrations (20, 80 and 160 ng mL⁻¹) and for both analytes the coefficients of variation were less than 13.0 % with acceptable accuracy. The LPME extraction followed by HPLC-fluorescence detection for FLU and NORFLU analysis, using venlafaxine as internal standard, showed excellent sample clean-up as well as high selectivity, being simple, inexpensive, and ease to perform, with a satisfactory enrichment of the drugs. The method was successfully applied to the analysis of samples from twelve patients under fluoxetine treatment and proved to be suitable in routine therapeutic drug monitoring of the antidepressants.

Key-words: Liquid-phase microextraction. High-performance liquid chromatography. Fluoxetine. Norfluoxetine. Plasma.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estruturas químicas dos antidepressivos inibidores seletivos da recaptção de serotonina.....	23
Figura 2 - Estereoisômeros da fluoxetina e norfluoxetina.....	26
Figura 3 - Representação esquemática de um sistema de membrana.....	32
Quadro 1 - Esquema das diferentes técnicas de extração em membranas.....	33
Figura 4 - Esquema básico da extração em LPME.....	36
Figura 5 - Extração do analito da fase aquosa através da fibra oca. (a) Sistema de três fases, (b) Sistema de duas fases.....	38
Figura 6 - Princípio da LPME mediada por carreador.....	40
Figura 7 - Foto da fibra porosa de polipropileno.....	41
Figura 8 - Configuração da fibra oca em formato de “U”.....	42
Figura 9 - LPME baseada na <i>rod-like</i>	42
Figura 10 - Esquema da posição da fibra oca para extração por LPME.....	43
Figura 11 - Cromatograma (1) norfluoxetina e (2) fluoxetina, soluções-padrão a 500 ng mL ⁻¹	57
Figura 12 - Cromatograma (1) venlafaxina, (2) norfluoxetina, (3) fluoxetina soluções-padrão de 50 ng mL ⁻¹	59
Figura 13 - Espectro de emissão de solução padrão de fluoxetina em metanol na concentração de 500 ng mL ⁻¹	60
Figura 14 - Estrutura química da venlafaxina (P.I.).....	60
Figura 15 - Sistema LPME utilizado.....	62
Figura 16 - Seleção do solvente orgânico para impregnação da fibra oca de polipropileno.....	63
Figura 17 - Influência do pH da amostra para extração de fluoxetina por LPME.....	64
Figura 18 - Influência do tempo de agitação na extração de fluoxetina por LPME.....	65
Figura 19 - Influência da velocidade de extração.....	66
Figura 20 - Seleção do tipo de solução aceptora para extração de fluoxetina por LPME.....	68
Figura 21 - Influência do pH ácido da solução aceptora.....	69

Figura 22 - Influência da adição de cloreto de sódio em diferentes quantidades.....	70
Figura 23 - Amostras de plasma branco (a), lipêmico (b) e hemolizado (c) extraídas por LPME.....	72
Figura 24 - Amostras de plasma fortificadas com 500 ng mL ⁻¹ de fluoxetina e extraídas por (A) LLE, utilizando <i>n</i> -hexano: álcool isoamílico (99:1, v/v) como solvente e 200 mg de NaCl e (B) LPME, sendo (1) fluoxetina e (2) norfluoxetina analisadas por HPLC-UV.....	73
Figura 25 - Curva analítica para fluoxetina (FLU), em amostras de plasma fortificadas nas concentrações de 5 a 500 ng mL ⁻¹ , extraídas por LPME.....	74
Figura 26 - Curva analítica para norfluoxetina (NORFLU), em amostras de plasma fortificadas nas concentrações de 5 a 500 ng mL ⁻¹ , extraídas por LPME.....	74
Figura 27 - Estabilidade dos analitos na solução aceptora ácida, mantida no autoinjeter, utilizando soluções-padrão de norfluoxetina e fluoxetina e do padrão interno, na concentração de 50 ng mL ⁻¹	78
Figura 28 - Amostra de paciente sob tratamento com fluoxetina 40 mg dia ⁻¹ . Sendo (1) venlafaxina, (2) norfluoxetina e (3) fluoxetina, extraída por LPME.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicação da LPME de duas e de três fases para extração de fármacos em material biológico.....	45
Tabela 2 - Parâmetros de conformidade do sistema para análise cromatográfica da venlafaxina (VENLF), fluoxetina (FLU) e norfluoxetina (NORFLU).....	59
Tabela 3 - Analitos e outros fármacos testados na avaliação da seletividade do método.....	71
Tabela 4 - Coeficientes de variação (% CV) obtidos para o estudo da precisão do método para fluoxetina (FLU) e norfluoxetina (NORFLU).....	76
Tabela 5 - Exatidão do método de análise de fluoxetina (FLU) e norfluoxetina (NORFLU).....	76
Tabela 6 - Percentual de recuperação relativa do método para análise de fluoxetina (FLU) e norfluoxetina (NORFLU).....	77
Tabela 7 - Concentrações plasmáticas (ng mL ⁻¹) de fluoxetina (FLU) e norfluoxetina (NORFLU) em 12 pacientes sob uso de fluoxetina.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

λ – comprimento de onda

AcN - acetonitrila

ADT – antidepressivo tricíclico

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CE – do inglês, *capillary electrophoresis* (eletroforese capilar).

CIT - citalopram

CV – coeficiente de variação

CYP – citocromo P-450

DPR – desvio padrão relativo

Em – emissão

Ex – excitação

FDA – *Food and Drug Administration*

FL – fluorescência

FLU – fluoxetina

FLUVOX – fluvoxamina

GC – do inglês, *gas chromatography* (cromatografia a gás).

HF – do inglês, *hollow fibre* (fibra oca).

HPLC – do inglês, *high-performance liquid chromatography* (cromatografia líquida de alta eficiência).

IMAO – inibidores da monoaminoxidase

ISRSN – inibidor seletivo da recaptação de serotonina e noradrenalina.

ISRS – inibidor seletivo da recaptação de serotonina

LLE – do inglês, *liquid-liquid extraction* (extração líquido-líquido).

LPME – do inglês, *liquid-phase microextraction* (microextração em fase líquida).

Log P – logaritmo do coeficiente de partição *n*-octanol/água

LIQ – limite inferior de quantificação

LQ – limite de quantificação

MeOH - metanol

MT – monitorização terapêutica

MS – do inglês *mass spectrometry*, espectrometria de massas

MMLLE – do inglês, *microporous membrane liquid-liquid extraction* (extração líquido-líquido em membrana porosa)

MASE – do inglês, *membrane-assisted solvent extraction*

MBSE – do inglês *membrane-based solvent extraction*

MBSS – do inglês *membrane-based solvent stripping*

NORFLU – norfluoxetina

PAROX – paroxetina

P.I. – padrão interno

pKa – função p da constante de ionização de um ácido

PTFE – politetrafluoretileno

rpm – rotações por minutos.

SBSE – do inglês, *stir bar sorptive extraction* (extração sortiva em barras de agitação).

SDME – do inglês, *single-drop microextraction* (microextração em gota suspensa)

SERT – sertralina

SLM – do inglês, *support liquid membrane* (extração líquida suportada por membrana).

SPE – do inglês, *solid-phase extraction* (extração em fase sólida).

SPME – do inglês, *solid-phase microextraction* (microextração em fase sólida).

UV – ultravioleta

VENLF – venlafaxina

ZI - zimelidina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina: fluoxetina	22
1.2	Preparo de amostras biológicas	28
1.2.1	Extração líquido-líquido.....	30
1.2.2	Extração em membranas.....	31
1.2.3	Microextração em fase líquida (LPME).....	35
1.2.3.1	Fundamentos da técnica.....	36
1.2.3.2	Sistemas de extração.....	37
1.2.3.3	Técnica e configuração da fibra.....	40
1.2.3.4	Recuperação e fator de enriquecimento.....	43
1.2.3.5	Otimização das variáveis do sistema.....	44
2	OBJETIVOS	47
3	MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1	Materiais	48
3.1.1	Reagentes e solventes.....	48
3.1.2	Soluções-padrão.....	48
3.1.3	Equipamentos e outros materiais.....	49
3.1.3.1	Cromatógrafo a líquido.....	49
3.1.3.2	Materiais empregados para LPME.....	49
3.1.3.3	Outros equipamentos e acessórios.....	50
3.1.4	Amostras de plasma.....	50
3.2	Métodos	51
3.2.1	Condições cromatográficas.....	51
3.2.2	Otimização da extração em LPME.....	52
3.2.3	Procedimento de preparação das amostras – LPME.....	52
3.2.4	Parâmetros de validação do método.....	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1	Condições cromatográficas	57
4.2	Otimização da extração em LPME	61
4.3	Parâmetros de validação do método	71
4.4	Aplicação do método	79
5	CONCLUSÕES	82
	REFERÊNCIAS	84
	APÊNDICES	93
	APÊNDICE A - Instrumento para a coleta de dados.....	93
	APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	94
	APÊNDICE C - Condições cromatográficas testadas usando o detector de fluorescência.....	96
	ANEXO	98
	Anexo A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	98

1 INTRODUÇÃO

A análise de fármacos em material biológico é de elevado interesse em diversas áreas de aplicação. Entre elas, podem ser citadas: a) monitorização terapêutica no uso prolongado de medicamentos, geralmente para os fármacos que apresentam baixo índice terapêutico e/ou grandes variações nas respostas de pacientes frente à mesma dose ingerida; b) estudos de biodisponibilidade e de bioequivalência; c) controle da farmacodependência para os fármacos que podem levar ao abuso; d) diagnóstico laboratorial de suspeita de uso de medicamento com finalidade suicida ou homicida, ou ainda, de intoxicações intencionais ou acidentais envolvendo medicamentos; e) em estudos de farmacocinética, em animais ou em humanos; f) em ensaios de toxicidade subcrônica ou crônica de novos fármacos, a fim de se relacionar a concentração plasmática ou tecidual com os efeitos adversos.

Dentre os fármacos para os quais é importante a determinação de valores plasmáticos estão os antidepressivos. Estas determinações são solicitadas, principalmente, com a finalidade de monitorização terapêutica (MT) e de diagnóstico laboratorial de intoxicações. A MT é indicada em diversas situações (SANTOS, 2008): a) quando existe boa correlação entre a resposta farmacológica e a concentração plasmática; b) ocorrência de larga variabilidade interindividual nas concentrações plasmáticas frente à mesma dose ou regime de dose do fármaco; c) há formação de metabólitos ativos de relevância clínica na biotransformação; d) o fármaco apresenta baixo índice terapêutico; e) os efeitos farmacológicos desejados não podem ser avaliados rápida e facilmente de outro modo.

A fluoxetina (FLU) é um antidepressivo, do grupo dos inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), bastante utilizado desde sua introdução na clínica médica, em 1988 (WONG; BIMASTER; ENGLEMAN, 1995). A monitorização terapêutica para a FLU pode ser indicada devido à formação de metabólito ativo, a NORFLU, assim como às variações individuais nas concentrações plasmáticas do fármaco e de seu metabólito. Segundo Baldessarini (2007), as concentrações séricas dos antidepressivos que se correlacionam significativamente com os efeitos clínicos não estão estabelecidas com confiança, exceto para aqueles do grupo dos tricíclicos.

O desenvolvimento de métodos analíticos mais sensíveis e seletivos, envolvendo as etapas, desde o preparo de amostra até identificação e quantificação das espécies de interesse, permite a obtenção de dados confiáveis para o acompanhamento clínico no uso de determinado fármaco. Na identificação e quantificação dos analitos, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) apresenta detectabilidade e seletividade adequadas para a aplicação clínica, sendo a técnica de escolha para análise de fármacos em material biológico (LEKE et al., 2004).

As técnicas de extração e/ou pré-concentração permitem que a análise dos componentes de interesse torne-se possível. A meta final é a obtenção de uma subfração da amostra original enriquecida com as substâncias de interesse analítico, de forma que se obtenha uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada em um tempo razoável de análise (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para análise de FLU e de NORFLU em fluidos biológicos. Na identificação e quantificação da FLU e NORFLU a técnica mais citada é a cromatografia líquida de alta eficiência com detector por absorção no ultravioleta (UV) (MAYA et al., 2000; EL-DAWY; MABROUK; EL-BARBARY, 2002; GATTI et al., 2003; LLERENA et al., 2003). A HPLC com detector por fluorescência (HPLC-FL) foi reportada por Raggi et al. (1998), Ertürk et al. (2005) e Vlase; Imre; Leucuta (2005) e a cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (HPLC-MS) por Fernandes et al. (2006), todas essas para análise de FLU em plasma. São também usadas a cromatografia gasosa (GC) acoplada a detector de nitrogênio e fósforo, com etapa de derivação do analito (FONTANILLE et al., 1997); a GC acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) (ADDISON; FRANKLIN; HOOPER, 1998) e a eletroforese capilar (LABAT et al., 2002).

As matrizes biológicas são amostras complexas que requerem tratamento prévio para posterior análise. Dentre as técnicas de preparo de amostra a extração líquido-líquido (LLE) é a mais utilizada (FONTANILLE et al., 1997; MAYA et al., 2000; EL-DAWY; MABROUK; EL-BARBARY, 2002; GATTI et al., 2003; LLERENA et al., 2003; ULRICH, 2003; ERTÜRK et al., 2005; VLASE; IMRE; LEUCUTA, 2005), seguida pela extração em fase sólida (SPE) (ADDISON; FRANKLIN; HOOPER, 1998; RAGGI et al., 1998; MOLANDER et al., 2002; JUAN; ZHILING; HUANDE, 2005). As técnicas miniaturizadas, como a microextração em fase sólida (SPME)

(FERNANDES et al., 2007) e a extração sortiva em barras de agitação (SBSE) (FERNANDES et al., 2006) são também relatadas na literatura para identificação de FLU ou de FLU e NORFLU.

1.1 Antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina: fluoxetina

Os antidepressivos são fármacos capazes de elevar o humor, restaurando pacientes deprimidos, visto que a depressão é um distúrbio que acomete a parte do cérebro responsável pela regulação do humor (SCIPPA; OLIVEIRA, 2006).

Estes fármacos foram descobertos no final da década de 50, e sua utilização na prática clínica foi de grande importância para o tratamento e para o entendimento de possíveis mecanismos relacionados ao transtorno depressivo (MORENO; MORENO; SOARES, 1999).

Os transtornos do humor estão relacionados a uma redução na transmissão dos impulsos nervosos nas áreas do cérebro que o regulam. As teorias atuais das causas biológicas da depressão atribuem este mal a uma falha na neurotransmissão, ou seja, a depressão está relacionada ao desequilíbrio dos neurotransmissores, associado aos fatores genéticos, histórico familiar, tipo de personalidade, estresse e perturbações bioquímicas (SCIPPA; OLIVEIRA, 2006).

A eficácia no controle da depressão tem sido verificada após o descobrimento das propriedades antidepressivas dos inibidores da monoaminoxidase (IMAO), dos antidepressivos tricíclicos (ADT), na década de 50, e dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina na década de 80. Estas descobertas trouxeram progresso no tratamento e no entendimento de possíveis mecanismos subjacentes aos transtornos depressivos (MORENO; MORENO; SOARES, 1999). Os IMAO e ADT, embora muito eficazes, apresentam efeitos colaterais indesejáveis causados pela falta de especificidade de sua ação farmacológica, e também por serem potencialmente letais em casos de superdose (MORENO; MORENO; SOARES, 1999; SCIPPA; OLIVEIRA, 2006).

Nos últimos anos vários antidepressivos foram introduzidos na terapêutica, entre eles, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS). Esses fármacos alteraram radicalmente o tratamento da depressão por serem mais aceitáveis em termos de tolerabilidade e toxicidade (MORENO; MORENO; SOARES, 1999; SCIPPA; OLIVEIRA, 2006; DE LUCIA et al., 2007). O primeiro ISRS comercializado foi a zimelidina (ZI), no início de 1970, logo seguida pelo desenvolvimento da FLU e fluvoxamina (FLUVOX) (CARLSSON; WONG, 1997). A ZI foi retirada do mercado devido a alguns efeitos adversos graves provocados nos pacientes. Assim, a FLU e a FLUVOX podem ser considerados os primeiros antidepressivos ISRS amplamente utilizados.

Os ISRS - citalopram (CIT), FLU, FLUVOX, paroxetina (PAROX) e sertralina (SERT) - inibem de forma potente e seletiva a recaptação de serotonina, resultando em potencialização da neurotransmissão serotoninérgica. Ainda que possuam o mesmo mecanismo de ação, são compostos estruturalmente diferentes como demonstrado na Figura 1, com diferenças no perfil farmacodinâmico e farmacocinético (JEPPESEN et al., 1996; GOODNICK, 1998; MORENO; MORENO; SOARES, 1999; SCIPPA; OLIVEIRA, 2006).

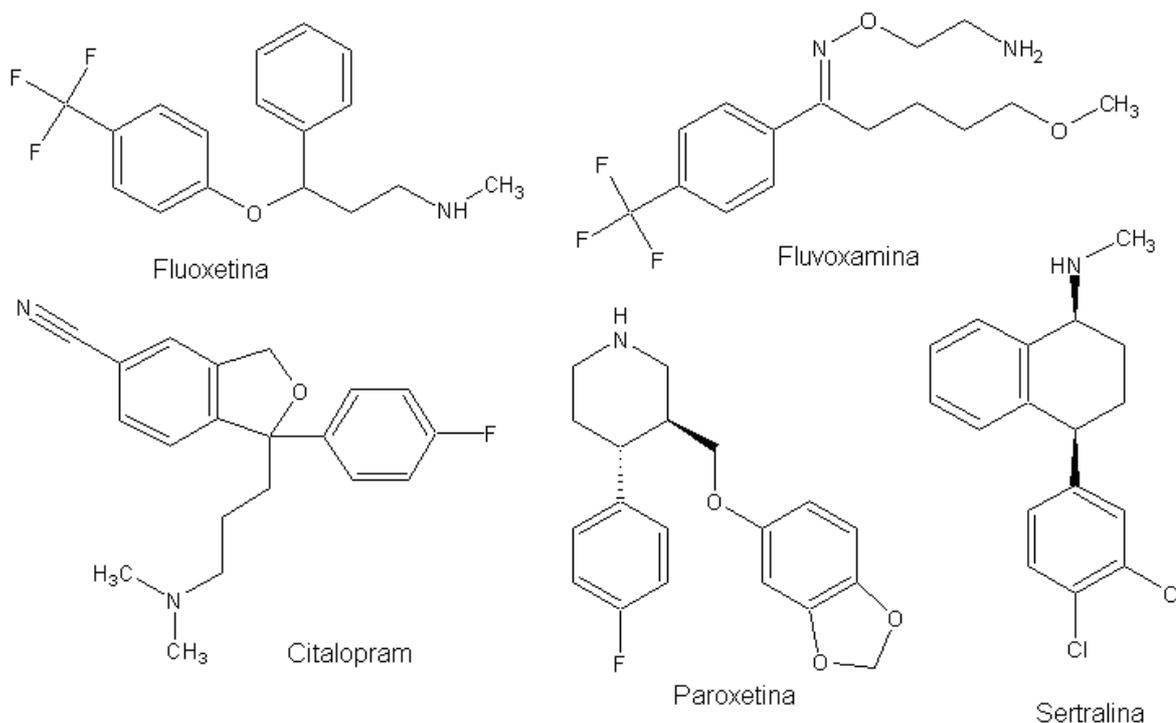


Figura 1 – Estruturas químicas dos antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina.

Com exceção da FLUVOX, todos os demais fármacos são compostos quirais. A FLU é comercializada como racemato enquanto que o CIT encontra-se disponível na forma de racemato e de enantiômero isolado. A SERT e a PAROX são comercializadas como enantiômeros independentes. A relação estrutura-atividade dos ISRS não está bem estabelecida, porém, sabe-se que o substituinte CF₃ da FLU eleva sua potência de ação no transportador de serotonina (MORENO; MORENO; SOARES, 1999).

Fluoxetina

Dentre os ISRS utilizados no mercado, o cloridrato de fluoxetina (cloridrato de N-metil-8-[4-(trifluorometil)fenoxi]-benzenopropanamina) é um dos antidepressivos mais utilizados no mundo. A fluoxetina é conhecida como “pai” dos ISRS. Apareceu na literatura científica em 1974 e, em 1987, teve seu uso como antidepressivo aprovado pela Food and Drug Administration (FDA), órgão de controle de medicamentos dos Estados Unidos (WONG; BYMASTER; ENGLEMAN, 1995; FERNANDES et al., 2006). Em 1988 foi introduzida no mercado pela “Eli Lilly” indústria farmacêutica, como Lilly 110140. A Figura 1 mostra a estrutura química deste composto que iniciou uma nova era de tratamentos efetivos e seguros para pacientes com depressão (WONG; BYMASTER; ENGLEMAN, 1995).

Desde então, a fluoxetina se tornou o fármaco antidepressivo mais prescrito em todo mundo e, com o passar dos anos, o seu emprego foi aprovado para uso em outras patologias (ROSSI; BARRACO; DONDA, 2004).

A fluoxetina é indicada principalmente para o tratamento da depressão; porém, outros usos foram estabelecidos através da clínica e de estudos clínicos controlados, tais como: transtorno obsessivo-compulsivo, bulimia nervosa, transtorno disfórico pré-menstrual, transtorno do pânico, transtorno bipolar, síndrome pré-menstrual e em algumas neuropatias (GUIA..., 2007).

As propriedades físico-químicas do cloridrato de fluoxetina são resumidas a seguir:

- a) pó branco ou praticamente branco e cristalino (United States Pharmacopeia-USP-30, 2007);

- b) solúvel em etanol e metanol, solubilidade moderada em água e diclorometano e praticamente insolúvel em éter etílico (MARTINDALE, 2002);
- c) fórmula molecular: $C_{17}H_{18}F_3NO.HCl$ (USP-30, 2007);
- d) massa molecular: 345,8 (USP-30, 2007);
- e) CAS: 54910-89-3 (MARTINDALE, 2002);
- f) pH da solução a 1%: 4,5 - 6,5, (USP-30, 2007);
- g) ponto de ebulição: 158,4 – 158,9 °C (USP-30, 2007);
- h) pKa da FLU: 10,05; logP da FLU = 4,47 (PLOEMEN et al., 2004).

No Brasil, os medicamentos disponíveis comercialmente com base na fluoxetina são: DAFORIN – (NOVA QUÍMICA-SIGMA) – cápsulas e solução oral 20 mg; DEPRAX – (ACHÉ) – cápsulas 20 mg; EUFOR 20 – (FARMASA) – comprimidos 20 mg; FLUXENE – (EUROFARMA) – cápsulas 20 mg; PROZAC – (ELI LILLY) – cápsulas, comprimidos e gotas 20 mg; VEROTINA – (LIBBS) – comprimidos 20 mg; PROZEN – (TEUTO) – cápsulas 20 mg; PSIQUIAL – (MERCK) – cápsulas 20mg; ZYFLOXIN – (ZYDUX) – cápsulas 20 mg; NEOFLUOXETIN – (NEOQUIMICA) – cápsulas 20 mg; FLUOX – (SOMA) – cápsulas 20 mg; DEPRESS – (UNIÃO) – cápsulas 20 mg (DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS, 2007/2008).

Na depressão e na doença obsessivo-compulsiva recomenda-se iniciar o tratamento com 20 mg dia⁻¹, em dose única pela manhã. Se não houver melhora após várias semanas de tratamento, considera-se aumentar a dose até 80 mg dia⁻¹. Doses acima de 20 mg dia⁻¹ devem ser divididas 2 vezes ao dia, não ultrapassando 80 mg dia⁻¹ (DJORDJEVIC et al., 2005; DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS, 2007/2008). As doses usualmente administradas são de 20 a 40 mg dia⁻¹, com variações posológicas de 5 a 50 mg dia⁻¹ (BALDESSARINI 2007).

Após a administração oral, a fluoxetina é absorvida quase que completamente, com ou sem alimentos; é uma molécula lipossolúvel que atravessa facilmente as membranas biológicas (CATTERSON; PRESKORN, 1996; HIEMKE; HÄTTER, 2000; SCIPPA; OLIVEIRA, 2006; BALDESSARINI, 2007). A FLU sofre efeito de primeira passagem e uma biodisponibilidade abaixo de 90% (cerca de 70% em média) com alta ligação às proteínas plasmáticas, em torno de 94% .

O volume de distribuição (Vd) da FLU é de 14 a 100 L kg⁻¹, o que indica acúmulo nos tecidos (principalmente nos pulmões) (CATTERSON; PRESKORN, 1996; HIEMKE; HÄTTER, 2000; DJORDJEVIC et al., 2005; SCIPPA; OLIVEIRA, 2006).

Na biotransformação, a fluoxetina passa por uma N-desmetilação pela isoenzima CYP2D6 do citocromo P-450, formando seu metabólito ativo, a norfluoxetina (HIEMKE; HÄTTER, 2000; DJORDJEVIC et al., 2005; BALDESSARINI, 2007). A FLU e NORFLU são misturas racêmicas, sendo os dois enantiômeros ativos no bloqueio do transporte da serotonina. Parece que os (S)-enantiômeros da FLU e da NORFLU são mais potentes do que os correspondentes (R)-enantiômeros: uma vez e meia para a FLU e vinte vezes para a NORFLU. As diferenças na biotransformação destes enantiômeros poderiam dificultar o estabelecimento da relação dose-efeito para a FLU entre os pacientes (GRAM, 1994; GATTI et al., 2003; ULRICH, 2003). A Figura 2 mostra os estereoisômeros da fluoxetina e da norfluoxetina.

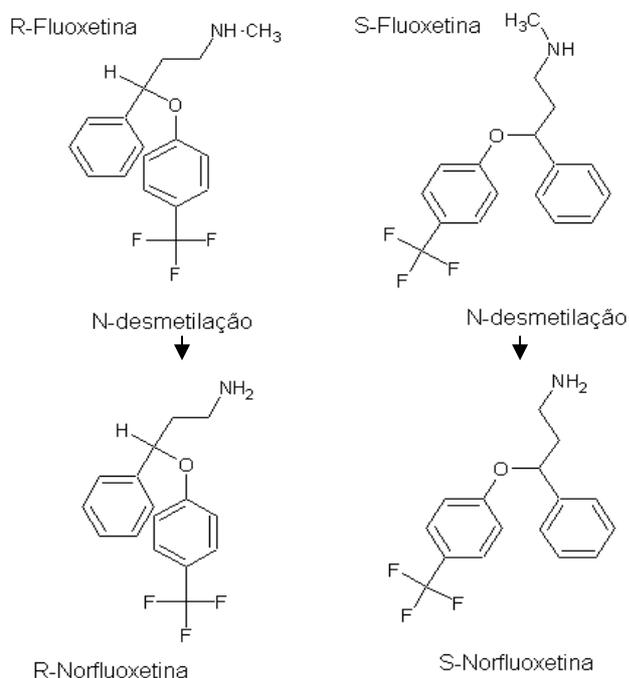


Figura 2 - Estereoisômeros da fluoxetina e norfluoxetina (WONG; BYMASTER, 1995).

A fluoxetina não possui farmacocinética linear, pois inibe sua própria biotransformação pelos seus efeitos inibitórios no citocromo P450 – CYP2D6. A sua

eliminação ocorre preferencialmente pela via renal com um tempo de meia-vida de 1 a 4 dias (depuração de $0,5 \text{ L min}^{-1}$); as aminas N-desmetiladas são eliminadas mais lentamente podendo conservar atividade farmacológica. A norfluoxetina possui ação prolongada com um tempo de meia-vida entre 7 e 10 dias, podendo requerer várias semanas para ser eliminada; também compete pelas CYP hepáticas e, dessa forma, eleva os níveis sanguíneos de outros fármacos (WONG; BYMASTER; REID, 1993; BALDESSARINI, 2007).

A fluoxetina possui ação seletiva bloqueando a recaptação de serotonina nos receptores 5-HT₁, 5-HT₂ e 5-HT₃, e elevando a concentração de serotonina na fenda sináptica (SCIPPA; OLIVEIRA, 2006). Ela age bloqueando o transporte neuronal da serotonina a curto e longo prazo, acarretando respostas secundárias complexas. A estimulação dos receptores 5-HT₃ contribui para os efeitos adversos mais comuns, os gastrintestinais e sexuais. A estimulação no receptor 5-HT_{2c} contribui para a agitação ou a inquietude observadas em alguns pacientes (BALDESSARINI, 2007).

No sistema serotoninérgico, os auto-receptores do subtipo 5-HT₁ suprimem os neurônios serotoninérgicos nos núcleos da rafe do tronco cerebral, inibindo a triptofano hidroxilase e a liberação neuronal de serotonina. O tratamento prolongado induz à hiporregulação e à dessensibilização gradativa dos mecanismos auto-receptores depois de várias semanas, com retorno ou aumento da atividade, produção e liberação pré-sinápticas da serotonina. Os principais efeitos adversos da fluoxetina são (BLIER; SERRANO; SCATTON, 1990; BALDESSARRINI, 2007):

- a) sistema nervoso central: ansiedade, insônia, nervosismo, sonolência, transtorno cognitivo, tonturas, alterações visuais, cansaço, pesadelos, tremores, mania e convulsão;
- b) sistema respiratório: dor torácica, tosse, dificuldade respiratória;
- c) sistema cardíaco: taquicardia;
- d) sistema gastrintestinal: náuseas, diarreias, vômitos, perda ou aumento do apetite, perda de peso, dor epigástrica, alteração do paladar, constipação, flatulência, boca seca;
- e) sistema genito-urinário: redução da libido, impotência, dor menstrual;
- f) síndrome dermatológica: alopecia, foto-sensibilidade, exantema, urticária, reação alérgica, dermatite alérgica, síndrome semelhante à doença do soro;

- g) outros: aumento da sudorese, febre, calafrios, mialgia, dor articular, congestão nasal, hipoglicemia, hiponatremia, linfadenopatia;
- h) síndrome serotoninica: ocorre quando são associados dois fármacos inibidores da serotonina; não é comum, os sintomas são moderados, mas pode ocorrer complicações graves, como convulsão, coagulação intravascular disseminada, insuficiência respiratória, hipertemia grave e, ocasionalmente, a morte.

Os efeitos adversos da fluoxetina são quase sempre leves, ocorrendo no início do tratamento, e são dose-dependente; podem desaparecer com a continuação do tratamento. Em alguns casos, há necessidade de redução da dosagem ou a substituição do fármaco. Concentrações plasmáticas acima de 500 ng mL⁻¹ são consideradas concentrações de risco de aparecimento de efeitos tóxicos (BAUMANN, 1996).

1.2 Preparo de amostras biológicas

De maneira geral, o processo analítico está dividido em: amostragem, preparação da amostra, separação, detecção e análise dos dados. As duas primeiras etapas (amostragem e preparação da amostra) são etapas críticas, sendo que o preparo da amostra inclui o procedimento da limpeza da amostra com o objetivo de trazer o analito a um nível de concentração apropriado (KATAOKA, 2003).

Materiais biológicos são complexos e muitas vezes contêm proteínas, sais, bases, lipídeos, carboidratos e compostos orgânicos, às vezes similares quimicamente aos analitos. Por outro lado, os analitos podem estar em quantidades muito pequenas na amostra e ainda ligados às proteínas (KATAOKA; LORD, 2002). Assim, as análises de substâncias químicas em baixos teores presentes em matrizes complexas usualmente requerem algum tipo de preparação da amostra antes da aplicação de técnica cromatográfica, ou outra técnica de identificação e/ou quantificação do analito.

O preparo de amostra num processo analítico tipicamente consiste na extração de componentes de interesse da matriz e o procedimento varia no grau de seletividade, velocidade e conveniência, e sua otimização, para cada situação, é de importância relevante no procedimento analítico. A escolha de um processo deve ser fundamentada na compreensão dos princípios que governam a transferência de massa dos analitos em sistemas multifásicos (PAWLISZYN, 2002).

Os objetivos da análise indicam quanto de esforço deve ser envidado no preparo da amostra. Por exemplo, a monitorização terapêutica requer especificidade para distinguir o fármaco de seus metabólitos similares quimicamente ou de outros fármacos co-administrados. Como resultado, os seguintes quesitos são necessários para se ter um eficiente preparo da amostra (KATAOKA; LORD, 2002; JÖNSSON; MATHIASSEN, 2003): a) perda mínima da amostra e boa recuperação do analito; b) componentes existentes na amostra e sem interesse devem ser removidos eficientemente; c) o fator de enriquecimento deve ser o mais alto possível; d) não devem ocorrer problemas no sistema cromatográfico; e) o procedimento deve ser feito de forma conveniente e rápida; f) se possível, o processo deve ser miniaturizado e automatizado; g) o custo da análise não deve ser elevado.

As principais técnicas aplicadas na preparação de amostras biológicas para a análise cromatográfica de fármacos são a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida.

As técnicas miniaturizadas como a microextração em fase líquida (*Liquid Phase Micro Extraction*, LPME) e a microextração em fase sólida (*Solid Phase Micro Extraction*, SPME), em fibras e em barras de agitação (*Stir Bar Sorptive Extraction*, SBSE), foram introduzidas nos últimos anos. Estas são técnicas de preparo de amostra mais rápidas, simples, menos onerosas e ambientalmente apropriadas, devido a não utilização ou a redução do uso de solventes orgânicos (KATAOKA; LORD, 2002; PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004; DE OLIVEIRA et al., 2008).

Dentre as técnicas mais modernas que se utilizam dos mesmos princípios da extração líquido-líquido, com menor gasto de solventes, tem-se a extração em membranas – principalmente, a *Supported Liquid Membrane* (SLM) e a *Microporous Membrane Liquid-Liquid Extraction* (MMLLE) - e uma de suas variedades, a LPME.

1.2.1 Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido é um dos processos mais antigos e ainda hoje amplamente utilizado no preparo de amostras. Esta técnica envolve a distribuição dos componentes da matriz entre dois líquidos imiscíveis. Na separação, por partição, os analitos são removidos de uma matriz aquosa para um solvente orgânico, onde se dissolvem (ou são absorvidos). Em seu formato mais clássico é usado um funil de separação contendo a amostra líquida e o solvente extrator.

Como em qualquer técnica de extração, a finalidade da LLE é a limpeza da amostra (*clean-up*) e a pré-concentração dos analitos. A primeira finalidade requer elevada seletividade para separar os analitos dos interferentes potenciais da matriz, enquanto a segunda é favorecida por um alto coeficiente de distribuição, o que permite a extração dos analitos de grandes volumes de amostra em pequenos volumes do extrator.

A LLE pode ser um processo exaustivo de extração; o coeficiente de partição é estabelecido entre as duas fases, aquosa e orgânica, segundo a Lei de Nernst e é influenciado pela escolha do solvente extrator, pH da fase aquosa e proporção do volume das fases (SCHILL, 1978; QUEIROZ, 2008).

O movimento de uma espécie química de uma fase para a outra continua até que seja atingido o equilíbrio na distribuição das fases, ou seja, quando a concentração da espécie na fase orgânica com relação à sua concentração na fase aquosa é dada pelo coeficiente de distribuição no equilíbrio ou coeficiente de partição (CANTWILLE; LOSIER, 2002).

$$K = C_{org} / C_{aq}$$

Sendo K o coeficiente de distribuição ou de partição; C_{org} a concentração do analito no solvente extrator e C_{aq} a concentração residual na amostra aquosa. Assim, quanto maior a afinidade do analito pelo solvente extrator, maior a constante de distribuição, o que torna a escolha do solvente de grande importância para maior rendimento da extração. Para valores mais altos de K ($K > 100$) é possível realizar a extração numa única etapa. Por outro lado, com um valor baixo de K ($K < 10$), o processo pode ser repetido duas ou três vezes usando novas porções de solvente orgânico para aumentar o rendimento da extração dos analitos. Para compensar a

elevada quantidade de solvente usado, o mesmo é evaporado até um pequeno volume, permitindo assim a concentração dos analitos (JÖNSSON; MATHIASSEN, 2003).

Na extração de fármacos de material biológico, o pH da amostra pode favorecer a forma não dissociada, mais lipofílica, do analito de caráter básico ou ácido. Por outro lado, também é muito utilizada a adição de sal (efeito *salting out*) que aumenta a remoção do analito da fase aquosa para a fase orgânica.

Uma série de vantagens pode ser citada para a LLE: a) capacidade linear de amostra é elevada; b) formato simples – funil de separação ou tubos de centrífuga; c) o extrato orgânico pode ser diretamente submetido à análise quantitativa, como a GC ou HPLC; d) a re-extração dos analitos da fase orgânica pode aumentar a seletividade da técnica e/ou promover a pré-concentração dos analitos; e) a grande variedade de solventes disponíveis e o conhecimento acumulado nas últimas décadas sobre o comportamento dos mesmos (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001; CANTWILLE; LOSIER, 2002).

Por outro lado, uma série de desvantagens é apontada na LLE: a) tempo prolongado para a separação das fases; b) formação de emulsão; c) quantidades relativamente altas de solventes orgânicos; d) problemas de descarte dos solventes, geralmente tóxicos; e) impureza dos solventes, que são concentradas junto com os analitos; f) dificuldades de automação do processo. Apesar dessas desvantagens, a LLE continua sendo bastante utilizada, principalmente devido à seletividade na extração e à obtenção de extratos limpos (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Para limitar as desvantagens da LLE, sem perder suas vantagens, novos formatos desta técnica têm sido desenvolvidos, os principais, a SLM, a MMLLE e a LPME, esta em gota de solvente orgânico imiscível com água (*microdrop*) ou em pequenos volumes de uma solução aceitadora colocada no lúmen de fibras ocas (HF-LPME).

1.2.2 Extração em membranas

As técnicas de extração em membranas podem ser divididas em duas categorias: membranas porosas e não porosas. Outra distinção é com relação ao

número de fases, geralmente duas ou três. Em todos os tipos de extração com membranas, a membrana separa a solução da amostra (fase doadora) da solução aceptora e as moléculas do analito passam, através da membrana, da solução doadora para a aceptora, processo também denominado de permeação (JÖNSSON; MATHIASSEN, 2001). A Figura 3 mostra um esquema do sistema de extração por membrana.

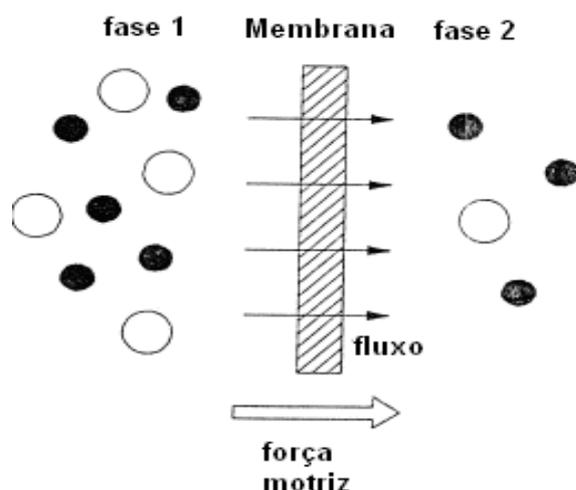


Figura 3 – Representação esquemática de um sistema de membrana (VAN DER MERBEL, 1999).

Se o sistema é deixado em contato por tempo suficiente é atingido o equilíbrio entre as fases. Para aumentar a recuperação da extração, a solução doadora, em muitos casos, flui continuamente através da membrana (processo dinâmico). Em algumas situações, os analitos são sequestrados pelo acceptor ou por uma reação química o que leva a um elevado fator de enriquecimento (processo estático) (JÖNSSON; MATHIASSEN, 2001; JÖNSSON, 2003).

As técnicas de membranas porosas envolvem filtração ou diálise em diferentes formatos. As soluções de ambos os lados da membrana estão em contato físico através dos poros da membrana. Na filtração, a solução doadora passa através da membrana, enquanto na diálise não ocorre fluxo desta fase através da membrana.

As técnicas com membranas não porosas envolvem o uso de membranas de material polimérico não poroso ou um líquido suportado em uma membrana porosa.

Na maioria das técnicas com membranas não porosas, a membrana forma uma fase separada (polimérica ou líquida) entre a fase doadora e a aceptora, sistema de três fases. Também pode formar-se um sistema de duas fases quando a fase da membrana é a mesma de uma das outras fases, usualmente da fase aceptora (JÖNSSON; MATHIASSEN, 2000; JÖNSSON; MATHIASSEN, 2001).

O Quadro 1 mostra as combinações de fases comumente usadas na extração com membranas, em análises químicas.

Quadro 1 - Esquema das diferentes técnicas de extração em membranas (JÖNSSON; MATHIASSEN, 2001).

Membrana	Sol. Doadora	Membrana	Sol. aceptora
SLM	Aquosa	Orgânica líquida	Aquosa (t)
PME	Aquosa/orgânica	Polímero	Aquosa (t)/ orgânica
MESI	Aquosa/orgânica	Polímero	Gás/ sorvente
MIMS	Aquosa/orgânica	Polímero	Vácuo
Difusão gases	Aquosa	Poros	Aquosa
MMLLE	Aquosa	Solvente	Solvente
Diálise	Aquosa		Aquosa
ASTED	Aquosa		Aquosa/sorvente

SLM = Supported Liquid Membrane; PME = Polymeric Membrane Extraction; MESI = Membrane Extraction Sorbent Interface; MIMS = Membrane Introduction-Mass Spectrometry; MMLLE = Microporous Membrane Liquid Liquid Extraction; ASTED = Automated Sequential Trace Enrichment of Dialysis; t = *trapping react*

Na técnica de extração líquido-líquido com membranas há preservação da versatilidade da LLE com maior isolamento e enriquecimento, além de uso de quantidades menores de solvente orgânico (JÖNSSON; MATHIASSEN, 2001; JÖNSSON; MATHIASSEN, 2003).

Extração líquida suportada por membrana (SLM)

A extração líquida suportada por membrana é uma técnica de extração em membrana com base em um sistema aquoso-orgânico-aquoso; portanto, um sistema de três fases, formato mais frequentemente utilizado. Neste sistema, a fase orgânica é retida no interior de poros de uma membrana suporte hidrofóbica, por forças

capilares, e separa as fases aquosa e extratora. Usualmente, a amostra é bombeada ao longo de um lado da membrana, permitindo que moléculas neutras distribuam-se entre a fase doadora e o solvente orgânico e depois entre o solvente orgânico e a fase aceptora. Na fase aceptora elas tornam-se carregadas e são impedidas de voltar para a solução orgânica (JONSSON, 2003).

Os solventes mais usados na SLM são hidrocarbonetos de cadeia longa como o *n*-undecano ou querosene e compostos mais polares como o éter diexílico. Podem ser usados aditivos na fase orgânica para aumentar a eficiência e seletividade da extração, ainda que com perda da durabilidade da membrana. A extração SLM é análoga à LLE com re-extração, ou seja, analitos de uma amostra aquosa são extraídos num solvente orgânico, seguindo a re-extração dos analitos da fase orgânica para uma fase aquosa (JÖNSSON; MATHIASSEN, 2001).

Extração líquido-líquido em membrana porosa (MMLLE)

A extração líquido-líquido em membrana porosa é um processo de extração em duas fases. Na MMLLE uma membrana porosa (suporte) separa uma fase aquosa de uma fase orgânica. Como as duas fases são separadas não há risco de formação de emulsão (JONSSON, 2003). Outras designações como *Membrane-Assisted Solvent Extraction* (MASE), *Membrane-Based Solvent Extraction* (MBSE) e *Membrane-Based Solvent Stripping* (MBSS), são termos usados para virtualmente a mesma técnica (JÖNSSON; MATHIASSEN, 2001).

Como na MMLLE a fase aceptora é um solvente orgânico, esta técnica é mais facilmente acoplada diretamente com a cromatografia gasosa ou com a cromatografia líquida em fase normal. Na extração com o acceptor orgânico a eficiência do processo é limitada pelo coeficiente de partição; se este for elevado é possível trabalhar com a fase aceptora estática e ainda se ter alto fator de enriquecimento (usando um volume de extrator pequeno). Se o coeficiente de partição é baixo pode ser necessário passar a fase aceptora numa vazão baixa (processo dinâmico) para remover o analito extraído e manter a difusão através da membrana (JÖNSSON; MATHIASSEN, 2001).

A membrana que separa as duas fases é tipicamente uma membrana flexível de politetrafluoretileno (PTFE) ou uma fibra tubular oca feita de polipropileno com espessura, tamanho de poro e porosidade bem definida. Estes polímeros são

hidrofóbicos e inertes à maioria dos solventes orgânicos, como também às soluções básicas ou acídicas. Assim, a estrutura tridimensional da membrana não é afetada por nenhuma das fases e as constantes de partição, considerando o solvente orgânico retido nos poros, podem ser as mesmas que para o solvente puro. Entretanto, o caráter do poro da membrana tem um efeito de exclusão por tamanho. É relatado que a quantidade de lipídios do plasma coextraídos é reduzido em mais de 90% comparado à LLE convencional com o mesmo solvente (JONSSON, 2003).

Problemas relacionados ao uso de membranas MMLLE e SLM têm sido descritos, como a falta de estabilidade das membranas e o efeito de memória (*carry over*), pois são utilizadas várias vezes, além de requererem sistemas de extração e de controle da vazão, nos sistemas dinâmicos mais eficazes (VAN DER MERBEL, 1999).

1.2.3 Microextração em fase líquida (LPME)

A extração estática, no seu mais simples formato, é designada de LPME e será descrita em maiores detalhes a seguir.

A miniaturização da LLE, ou microextração em fase líquida foi introduzida em 1996, com base na microextração em gota suspensa (SDME, do inglês, *Single-Drop Micro Extraction*) (ZHAO; LEE, 2001; PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

Na SDME a extração é realizada com o uso de uma micro-gota de solvente orgânico, contida em uma microsseringa, que é introduzida na amostra aquosa, resultando em um microextrato (JEANNOT; CANTWILLE, 1996). Embora seja uma técnica simples, barata e rápida, requer operações manuais que exigem cautela, afetando a estabilidade do extrato final (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005; DIETZ et al., 2006). Os problemas relacionados com a estabilidade da gota e a falta de seletividade contribuíram para o desenvolvimento da microextração em fase líquida utilizando uma fibra oca, processo conhecido como HF-LPME (*Hollow Fibre - Liquid Phase Micro Extraction*) ou simplesmente de LPME.

1.2.3.1 Fundamentos da técnica

A Figura 4 ilustra o princípio básico da LPME em fibra oca, onde a amostra aquosa é colocada em um frasco pequeno, no qual é introduzido um pedaço da fibra oca de polipropileno poroso (DIETZ et al., 2006; PAVLOVIC et al., 2007; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008). O volume da amostra é geralmente de 0,1 – 4,0 mL, dependendo da aplicação e do comprimento da fibra (1,5 - 10 cm) (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004; FLANAGAN et al., 2006).

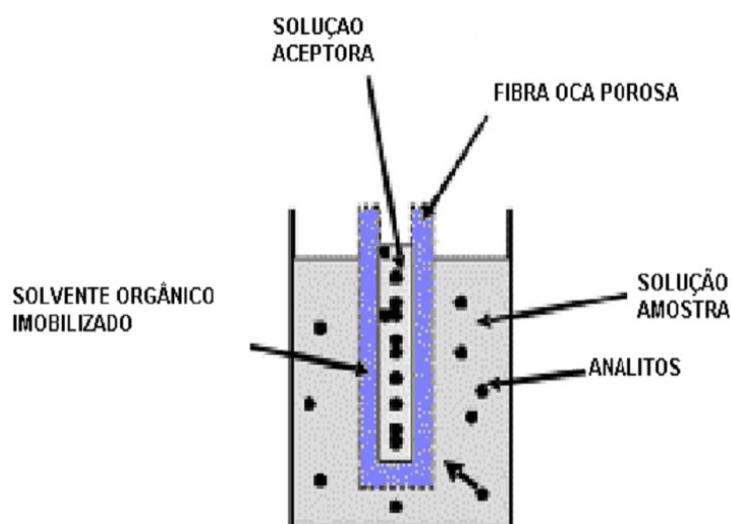


Figura 4 – Esquema básico da extração em LPME (RASMUSSEN, PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

A fibra é previamente embebida em um solvente orgânico, imobilizando assim o solvente nos seus poros para futura extração. O excesso de solvente é removido usando ultrassom (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

O solvente deve ser imiscível com a água e ser fortemente imobilizado nos poros da fibra, assegurando que não haja perdas para a solução da amostra. Ele forma uma fina camada na parede da fibra com espessura aproximadamente de 200 μm , tendo um volume total imobilizado de 15 a 20 μL (UGLAND; KROGH;

REUBSAET, 2003; RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005; FLANAGAN et al., 2006).

O pH da amostra é ajustado de maneira que os analitos ionizáveis fiquem na sua forma não ionizada, reduzindo assim a solubilidade do analito na amostra aquosa e favorecendo sua extração (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005). Basicamente, o analito é extraído da amostra, através da fase orgânica, para a fase acceptora que se encontra no lúmen da fibra.

O solvente deve possuir baixa solubilidade e ser imiscível com a água para impossibilitar a perda do analito para a solução da amostra (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005). O solvente usado para impregnar os poros da fibra poderá ser utilizado como solução acceptora, resultando em um sistema de extração de duas fases que posteriormente será discutido com maiores detalhes.

A amostra ↔ A acceptor orgânico

Quando a fase acceptora é uma solução aquosa diferente do solvente orgânico, o analito é extraído em um sistema de três fases. Este sistema é indicado para analitos básicos e ácidos, ionizáveis (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005; FLANAGAN et al., 2006; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008).

A amostra ↔ A fase orgânica ↔ A acceptor aquoso

A obtenção de um alto coeficiente de partição durante a extração (por difusão passiva) se faz necessária, independentemente do sistema utilizado (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005).

1.2.3.2 Sistemas de extração

Sistema extrator de duas fases

É aplicado para analitos com alta solubilidade em solventes orgânicos apolares (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005). O analito é extraído de uma solução doadora (amostra

aquosa) através de um solvente orgânico immobilizado dentro da fibra oca. Este mesmo solvente é utilizado para impregnação dos poros da fibra (FIGURA 5, b).

Este processo pode ser representado da seguinte forma:



O coeficiente de distribuição é: $K = SO/SD$ e é definido pela relação entre as concentrações do analito no solvente orgânico e na fase doadora, em condições de equilíbrio (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003).

O sistema LPME de duas fases requer alto coeficiente de partição (distribuição) para o analito, resultando na fase orgânica como extrato final, compatível com técnicas cromatográficas como GC e HPLC em fase normal (RASMUSSEN et al., 2000).

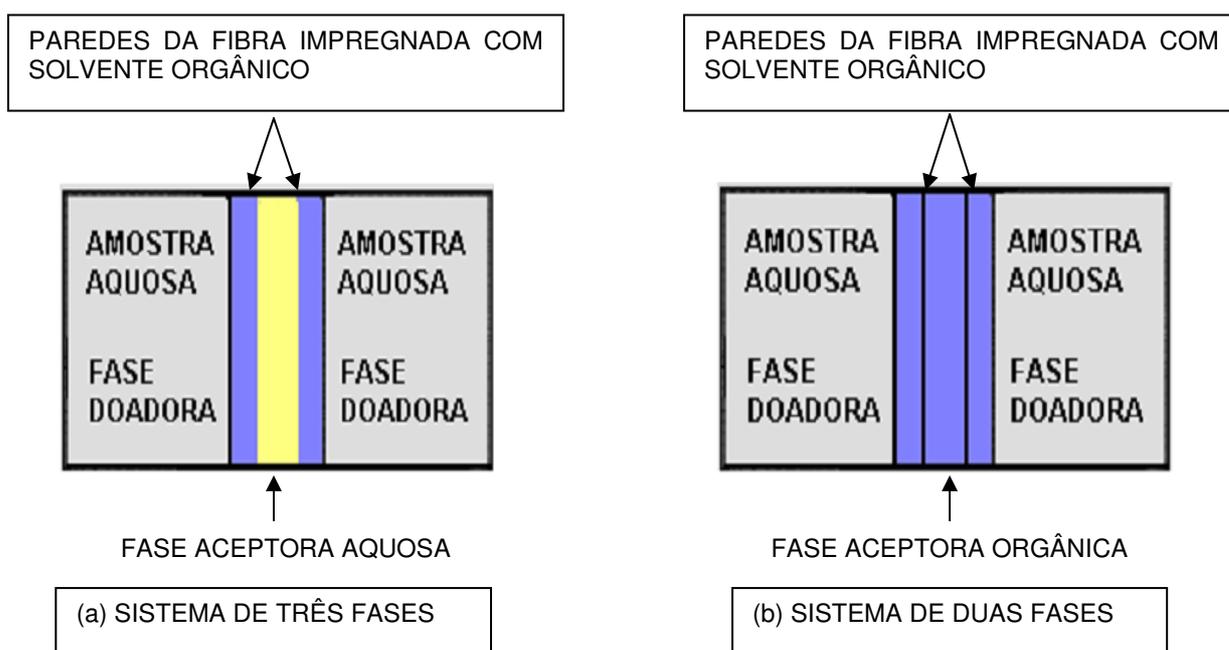


Figura 5 - Extração do analito da fase aquosa através da fibra oca. (a) Sistema de três fases, (b) Sistema de duas fases (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005).

Sistema extrator de três fases

No sistema de três fases o analito “A” é extraído da amostra aquosa pelo solvente orgânico immobilizado nos poros da fibra oca, para outra solução, a solução

acceptora (Figura 5, a) (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; UGLAND; KROGH; REUBSAET, 2003; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2004).

A doadora (SD) ↔ **A** solvente orgânico (SO) ↔ **A** acceptora (SA)

A fase orgânica apresenta-se como uma barreira entre a fase doadora (amostra aquosa) e a fase acceptora, evitando assim a mistura entre as fases. Este tipo de extração é comumente realizado para a análise por HPLC em fase reversa ou eletroforese capilar (RASMUSSEN et al., 2000). Este 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:

$$K_{SA/SD} = K_{SO/SD} \cdot K_{SA/SO}$$

O ajuste da composição das fases doadora e acceptora é uma etapa crítica para LPME de três fases. Elevado $K_{SA/SD}$ pode ser alcançado quando os analitos na fase acceptora são convertidos por reações, como de protonação ou de complexação, para espécies que apresentam afinidade muito baixa pela fase orgânica. Assim, o retorno dos analitos da fase acceptora é evitado (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003).

Sistema mediado por carreador (transportador)

É um sistema usado para extrair analitos polares através da fibra oca (fármacos alcalinos com coeficiente de partição < 1). É utilizado um carreador que se liga ao analito formando um par iônico, permitindo assim que ocorra a extração (HO et al., 2003; PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005; ZHANG et al., 2008).

A Figura 6 mostra um modelo deste sistema. A extração ocorre em três etapas independentes. Inicialmente é adicionada na amostra aquosa a solução tampão e um carreador; a solução tampão ajusta o pH da amostra de forma que o analito reaja com o carreador formando o par iônico hidrofóbico, que é extraído através do solvente orgânico da membrana. Na região de contato entre o solvente orgânico e a fase acceptora, o analito é liberado para a fase acceptora por troca iônica

e o carreador volta para a solução da amostra após sua neutralização por prótons na fase aceptora. Este mecanismo é cíclico (HO et al., 2003; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005).

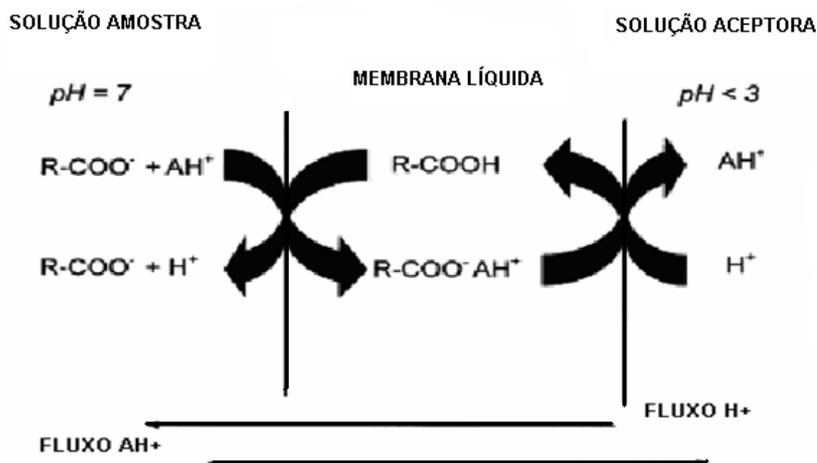


Figura 6 - Princípio da LPME mediada por carreador (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005).

1.2.3.3 Técnica e configuração da fibra

Na LPME é utilizada fibra oca de polipropileno, escolhida por ser compatível com grande quantidade de solventes orgânicos, além de possuir características relevantes para o processo de extração: pequeno tamanho do poro (0,2 μm) e excelente imobilização dos solventes orgânicos, além de grande área superficial que facilita o contato com a solução da amostra (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

A fibra deve ser hidrofóbica e compatível com o solvente orgânico usado na extração em questão. Em quase todos os trabalhos publicados que foram consultados foi utilizada membrana capilar de polipropileno, com diâmetro interno 600 μm , espessura da parede 200 μm e tamanho dos poros entre 0,20 – 0,64 μm (RASMUSSEN et al 2000; PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005). O solvente orgânico a ser usado deve ser imiscível com água, fortemente

impregnado nos poros da fibra e permitir extrações seletivas com altas recuperações. A Figura 7 mostra uma fotografia da fibra.



Figura 7 – Foto da fibra porosa de polipropileno.

Para a LPME de três fases, os solventes mais comuns são o *n*-octanol e o éter diexílico, mas existem relatos sobre o uso de outros solventes: *n*-hexano, octano, nonano, diclorometano, acetato de butila, 2-octanona e éter dimetílico. O importante é que o solvente possua baixa volatilidade para que não haja perdas durante a extração (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

Para o sistema de duas fases o critério do solvente volátil contribui para a injeção direta do extrato no GC. O solvente mais usado neste sistema é o 1-octanol (PEDERSEN-BJERGAARD, RASMUSSEN, 2005).

Sobre as configurações da LPME, os primeiros modelos são “caseiros”. O diâmetro interno da fibra de polipropileno de 600 μm , com espessura 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” (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 1999; RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

Este formato (FIGURA 8) contribui para excelentes extrações, mas com a desvantagem da transferência da solução aceptora e a difícil automação (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

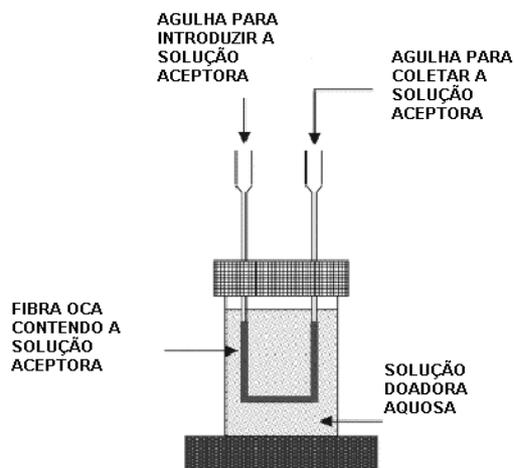


Figura 8 - Configuração da fibra oca em formato de “U” (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2004).

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

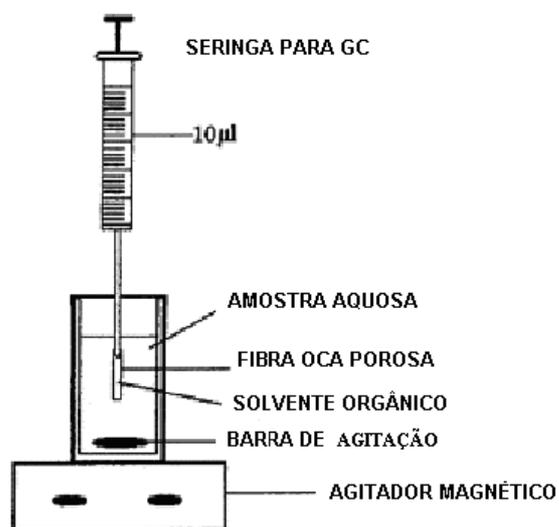


Figura 9 - LPME baseada na *rod-like* (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2004).

Com esta configuração, uma microsseringa pode ser utilizada para introduzir e remover a solução aceitadora. Este modelo é compatível com injetores automáticos (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

Uma outra configuração interessante foi desenvolvida por Müller et al. 2003, ilustrada na Figura 10. Com esta configuração a fibra não é lacrada e também pode ser utilizada uma microsseringa para introduzir e remover a solução aceptora. Com as extremidades da fibra abertas foi eliminado o problema de formação de bolhas na solução aceptora.

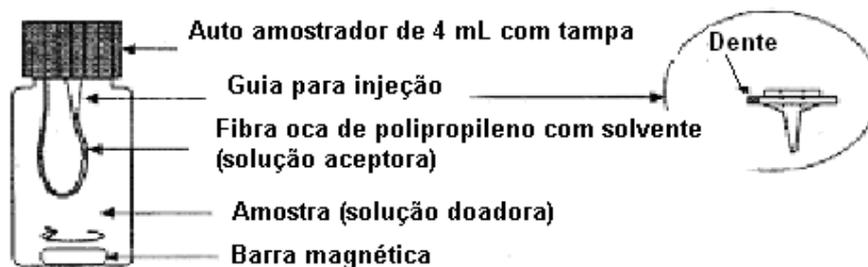


Figura 10 - Esquema da posição da fibra oca para extração por LPME (MÜLLER et al., 2003).

1.2.3.4 Recuperação e fator de enriquecimento

No sistema de duas fases, a recuperação (R) é calculada pela equação:

$$R = \frac{K_{SO/SD} V_{SO}}{K_{SO/SD} V_{SO} + V_{SD}} \times 100$$

A equação demonstra a quantidade total de analito, em porcentagem, que é transferida para a solução aceptora ao final da extração. Além do coeficiente de partição, a razão entre o volume de solução doadora (V_{SD}) e de solução aceptora (V_{SO}) também são importantes na recuperação do analito.

Utilizando esta equação, a recuperação real do sistema de duas fases é menor do que a calculada, pois, para a análise, está disponível somente a fração presente no lúmen da fibra; a fração imobilizada nos poros da fibra não é disponível. Assim, este sistema beneficia analitos hidrofóbicos, ou seja, com elevados coeficientes de partição (HO; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2002; DE OLIVEIRA et al., 2008).

No sistema LPME de três fases a recuperação (R) pode ser expressa como:

$$R = \frac{100 K_{SA/SD} V_{SA}}{K_{SA/SD} V_{SA} + K_{SO/SD} V_{SO} + V_{SD}}$$

Neste caso, a solução aceptora está totalmente disponível para análise fornecendo assim valores reais de recuperação (HO; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2002; RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

O fator de enriquecimento é um parâmetro frequentemente usado para demonstrar a eficiência dos processos de LPME, pois confirma o grau de concentração do analito que ocorreu durante a extração (HO; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2002).

O enriquecimento (E) de um analito pode ser calculado:

- no sistema de duas fases: $E = V_{SD} R / 100 V_{SO}$

- no sistema de três fases: $E = V_{SD} R / 100 V_{SA}$

1.2.3.5 Otimização das variáveis do sistema

Diversas são as variáveis da técnica que devem ser otimizadas no desenvolvimento de método de extração usando a LPME, como: solvente orgânico de extração; agitação da amostra; adição de sal; adição de modificadores; volume das soluções doadora e aceptora; ajuste de pH das fases aceptora e doadora; tempo de extração.

A literatura científica tem registrado, nos últimos anos, várias pesquisas que utilizaram a LPME na extração de substâncias químicas de matrizes diversas. A Tabela 1 mostra dados de uma recente revisão sobre o uso desta técnica na extração de fármacos de matrizes biológicas, pelo sistema de duas e de três fases.

Tabela 1 – Aplicação da LPME de duas e de três fases para extração de fármacos em material biológico (DE OLIVEIRA et. al., 2008) (continua)

FARMACO	AMOSTRA	SOLVENTE	FASE ACEPTORA	TIPO EXTRAÇÃO	SISTEMA ANALÍTICO^a
Aminoácidos	Urina	<i>n</i> -Octanol	HCl 0,1 mol L ⁻¹	Três fases	CE-UV
Anfetamina e análogos	Sangue total e urina	Éter diexílico	HCl 0,01 mol L ⁻¹	Três fases	MS
Antidepressivos	Plasma e sangue total	Acetato de dodecila	HCOOH 0,2 mol L ⁻¹	Três fases	HPLC-MS
Antidepressivos	Leite materno	Polifenilmetilsiloxinano	HCl 0,01 mol L ⁻¹	Três fases	CE-UV
Bifenilas policloradas	Plasma	Tolueno	Tolueno	Duas fases	GC-MS
Citalopram e <i>n</i> -Desmetilcitalopram (enantiômeros)	Plasma	Acetato de dodecila	Tampão fosfato 0,02 mol L ⁻¹ (pH 2,75)	Três fases	CE-UV
Citalopram e <i>n</i> -Desmetilcitalopram	Plasma	Éter diexílico	Tampão fosfato 0,02 mol L ⁻¹ (pH 2,75)	Três fases	CE-UV
Citalopram e <i>n</i> -Desmetilcitalopram	Plasma	<i>n</i> -Octanol	Tampão fosfato 0,02 mol L ⁻¹ (pH 3,0)	Três fases	HPLC-F
Cocaína e metabólitos	Saliva e urina	Clorofórmio	Clorofórmio	Duas fases	GC-PHID
Diazepam	Plasma e urina	Acetato de butila: <i>n</i> -octanol (1:1) ou éter diexílico: <i>n</i> -octanol (1:3)	Acetato de butila: <i>n</i> -octanol (1:1) ou éter diexílico: <i>n</i> -octanol (1:3)	Duas fases	GC-NPD
<i>n</i> -Desmetildiazepam					
Diazepam	Plasma	<i>n</i> -Octanol	<i>n</i> -Octanol	Duas fases	GC-NPD
Prazepam					
Esteróides anabolizantes	Urina	<i>n</i> -Octanol	NH ₃ 0,25 mol L ⁻¹	Três fases	HPLC-MS
Esteróides anabolizantes	Urina	<i>n</i> -Octanol	<i>n</i> -Octanol	Duas fases	HPLC-MS e GC-MS
Fenilpropanolamina	Plasma	<i>n</i> -Octanol	HCl 0,05 mol L ⁻¹	Três fases	CE-UV
Practolol					
Haloperidol, Metadona	Plasma e urina	Éter diexílico	HCl 0,01 mol L ⁻¹	Três fases	GC-FID e CE-UV
Prometazina					
Hidroxicloroquina e metabólitos (enantiômeros)	Urina	<i>n</i> -Octanol	HCl 0,1 mol L ⁻¹	Três fases	CE-UV
Ibuprofeno, Cetoprofeno	Urina	Éter diexílico	NaOH 0,01 mol L ⁻¹	Três fases	CE-UV
Naproxeno					
Mefloquina (enantiômeros)	Plasma	Éter diexílico	HClO ₄ 0,01 mol L ⁻¹	Três fases	HPLC-UV
Metanfetamina	Plasma e urina	<i>n</i> -octanol	HCl 0,1 mol L ⁻¹	Três fases	CE-UV
Metanfetamina e citalopram	Plasma, urina e sangue total	Éter diexílico	HCl 0,1 mol L ⁻¹	Três fases	HPLC-UV
Miaserin (enantiômeros)	Plasma	Éter diexílico	HCl 0,1 mol L ⁻¹	Três fases	CE-UV
Mirtazapina (enantiômeros)	Plasma	Tolueno	Tolueno	Duas fases	HPLC-UV

Tabela 1 - Aplicação da LPME de duas e de três fases para extração de fármacos em material biológico (OLIVEIRA et. al., 2008) (conclusão)

FARMACO	AMOSTRA	SOLVENTE	FASE ACEPTORA	TIPO EXTRAÇÃO	SISTEMA ANALÍTICO^a
Noradrenalina, atenolol e pindolol	Urina	<i>n</i> -octanol	HCl 0,1 mol L ⁻¹	Três fases	CE-UV
Opióides	Cabelo	<i>n</i> -octanol	HCl pH 2	Três fases	HPLC-UV
Salbutamol e terbutalina	Urina	Éter diexílico	NaBr 1 mol L ⁻¹	Três fases	HPLC-MS
THC-COOH	Urina	<i>n</i> -octanol	<i>n</i> -octanol	Duas fases	GC-MS

^aCE-UV: eletroforese capilar-espectrofotometria por absorção no UV-Vis; MS: espectrometria de massas; HPLC-MS: cromatografia líquida de alta eficiência-espectrometria de massas; GC-MS: cromatografia gasosa-espectrometria de massas; HPLC-F: cromatografia líquida de alta eficiência-espectrofotometria de fluorescência; GC-PHID: cromatografia gasosa-detector de ionização por descarga pulsada de hélio; GC-NPD: cromatografia gasosa-detector de nitrogênio e fósforo; GC-FID: cromatografia gasosa-detector por ionização em chama; HPLCUV: cromatografia líquida de alta eficiência-espectrofotometria por absorção no UV-Vis; THC-COOH: Δ^9 -carboxi-tetraidrocanabinol.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de método de microextração em fase líquida (LPME) como técnica de preparo de amostra de plasma para análise cromatográfica em fase líquida da fluoxetina e de seu metabólito ativo, a norfluoxetina, visando sua aplicação na monitorização terapêutica de pacientes que fazem uso do fármaco.

Para alcançar este objetivo, as etapas do trabalho desenvolvidas foram:

- a) otimização das condições cromatográficas para obtenção da melhor detectabilidade, eficiência e resolução da separação na análise de fluoxetina e norfluoxetina em amostras de plasma por HPLC;
- b) otimização das variáveis da técnica de LPME: solvente de extração para impregnação nos poros da fibra; tempo de extração; velocidade; modo de agitação da amostra; uso de modificador orgânico na amostra; adição de sal; pH da fase doadora; tipo e pH da solução aceptora;
- c) validação do método de acordo com os parâmetros: linearidade, precisão, limite de quantificação, exatidão, recuperação e seletividade;
- d) aplicação do método desenvolvido na análise de fluoxetina e norfluoxetina em amostras de pacientes que fazem uso do fármaco.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes e solventes

Os solventes utilizados para o preparo da fase móvel foram acetonitrila da VETEC[®] (Rio de Janeiro, Brasil) e metanol da J.T.BAKER[®] (Philipsburg, EUA), grau HPLC.

Os reagentes empregados no preparo da solução tampão constituinte da fase móvel foram acetato de sódio da PROQUÍMIOS[®] grau p.a. (Rio de Janeiro, Brasil) e ácido acético glacial da IMPEX[®] (Contagem, Brasil). Também foram testados os reagentes acetato de amônio ECIBRA[®] grau p.a. (São Paulo, Brasil) e o fosfato monobásico de potássio DINÂMICA[®] grau p.a. (Diadema, Brasil). No preparo da amostra foi usado hidróxido de sódio grau p.a. da LABSYNTH[®] (Diadema, Brasil) e cloreto de sódio grau p.a. da IMPEX[®] (Contagem, Brasil). Ácido clorídrico da marca VETEC[®] (Rio de Janeiro, Brasil), ácido perclórico da REAGEN[®] (Rio de Janeiro, Brasil) e ácido acético da IMPEX[®] (Contagem, Brasil) foram usados para fazer as soluções aceptoras. Metanol da J.T. BAKER[®] (Philisburg, EUA) e etanol da ISO FAR[®] (Jacaré, Brasil) foram testados como modificadores orgânicos na LPME.

Já os solventes utilizados na otimização da LPME foram: *n*-octanol e éter *n*-hexílico da SIGMA-ALDRICH[®] (St. Louis, EUA); hexano da MALLINCKRODT[®] (Paris, EUA) e tolueno da VETEC[®] (Rio de Janeiro, Brasil).

3.1.2 Soluções-padrão

O padrão de fluoxetina 99,05% de pureza foi adquirido da SIGMA-ALDRICH[®] (St. Louis, EUA) e o metabólito ativo, norfluoxetina, da SIGMA-ALDRICH[®] (Steinhein,

Alemanha). O padrão interno, venlafaxina (VENLF), foi adquirido da WYETH® (Madison, EUA). As soluções estoque de FLU e de VENLF foram preparadas a 1 mg mL⁻¹. Solução-padrão de trabalho de FLU a 10 µg mL⁻¹ foi usada na otimização da técnica de LPME. Para os experimentos de validação do método foram preparadas soluções-padrão de uso de FLU e NORFLU nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,5; 2,5; 5; 10 e 25 µg mL⁻¹ e de VENLF a 2,5 µg mL⁻¹, todas em metanol. Todas as soluções foram armazenadas a -20°C e protegidas da luz durante todo o procedimento (a solução estoque foi armazenada durante um mês e as de uso foram preparadas no dia do procedimento de validação e utilizadas durante uma semana). Estes períodos atendem os preconizados por Binsumait; Hadidi; Rachib (2001), em publicação sobre a estabilidade da FLU e NORFLU em solução metanólica (até 5 semanas), aquosa (até 3 semanas) e em plasma (até 2 semanas), quando conservadas a - 20°C.

3.1.3 Equipamentos e outros materiais

3.1.3.1 Cromatógrafo a líquido

Cromatógrafo a líquido de alta eficiência SHIMADZU® (Kyoto, Japão), modelo LC 10 AVP, equipado com bomba LC 10ADVP, forno de colunas CTO-10AS VP, injetor automático Sil -10 AF, detectores por absorção no UV-VIS SPD-10AVP, DAD SPD – M10AVP e por fluorescência RF-10A XL. Usou-se amostrador de 50 µL e os dados foram coletados e analisados pela LC-Workstation Class – VP da SHIMADZU®.

3.1.3.2 Materiais empregados para LPME

Na etapa de preparo da amostra por LPME foram empregados frascos de vidro com capacidade de 6 mL da SUPELCO® (Bellefonte, EUA), agitador de tubos

da CERTOMAT[®] MV (Frankfurt, Alemanha), dois agitadores magnéticos adquiridos da QUIMIS[®] (Diadema, Brasil), um com programação automática de rotação em rpm e outro sem programação automática, agitador magnético NOVA TÉCNICA[®] (Campinas, Brasil) e barra de agitação magnética de 1 cm da SIGMA-ALDRICH[®] (St. Louis, EUA). Microseringas da HAMILTON[®] (Reno, EUA), de 25 e 50 µL, foram usadas para introduzir e recolher a solução aceptora e também como suporte para as fibras. Foram utilizadas fibras ocas microporosas de polipropileno da Accurel[®] PP Q 3/2 (Wuppertal, Alemanha), com as seguintes dimensões: tamanho do poro de 0,2 µm, diâmetro interno de 600 µm e espessura da parede de 200 µm.

3.1.3.3 Outros equipamentos e acessórios

Lavadora ultra-sônica da UNIQUE[®] (Indaiatuba, Brasil), medidor de pH – MB 10 MARTE[®] (Campinas, Brasil), kit para filtração de fase móvel e purificador de água MilliQ da MILLIPORE[®] (Bedford, EUA), centrífuga NT 811 da marca NOVA TÉCNICA[®] (Piracicaba, Brasil), balança analítica KERN[®] 410 (Balingen, Alemanha).

3.1.4 Amostras de plasma

As amostras de plasma “branco” humano, livres de qualquer fármaco, foram fornecidas por voluntários da Universidade Federal de Alfenas e armazenadas a – 20 °C até o momento de serem usadas nos experimentos de otimização e validação do método. As amostras em uso foram descongeladas à temperatura ambiente e processadas.

As amostras de pacientes em uso de FLU foram coletadas de 12 voluntários, em diferentes regimes de dosagem (20 a 80 mg dia⁻¹). Essas amostras foram coletadas imediatamente antes da ingestão da próxima dose (concentração vale). Os voluntários foram antecipadamente informados e esclarecidos acerca do estudo e responderam um questionário (Apêndice A), quando da coleta das amostras. O

termo de consentimento foi assinado por todos (Apêndice B). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alfenas, Unifal-MG (Anexo A). Após a coleta, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 560 g, armazenadas, e conservadas a -20 °C até sua análise, realizada, no máximo, até 5 dias após a coleta.

3.2 Métodos

3.2.1 Condições cromatográficas

Os experimentos de otimização das variáveis da LPME foram realizados nas seguintes condições: coluna Lichrospher 60 RP – Select B, MERCK® (250 mm x 4 mm x 5 µm), e a fase móvel tampão acetato 0,25 mol L⁻¹ pH 5,5: acetonitrila (55:45, v/v), na vazão de 1,0 mL min⁻¹ e temperatura do forno de 25 °C. A detecção foi efetuada na região do ultravioleta com comprimento de onda ajustado em 230 nm.

Vários fármacos foram avaliados para uso como padrão interno: antidepressivos do grupo ADT (amitriptilina, clomipramina, doxepina e nortriptilina) do grupo dos ISRS (paroxetina e sertralina) do grupo dos ISRSN, a venlafaxina, a amina terciária sibutramina e o benzodiazepínico clonazepam. Estes fármacos foram testados nas condições otimizadas de separação cromatográfica empregando os detectores por absorção no UV e por fluorescência.

Devido à necessidade de se obter maior detectabilidade, passou-se a usar o detector por fluorescência, testando-se diversas colunas, fases móveis e comprimentos de excitação (Ex) e de emissão (Em), arrolados no Apêndice C.

O desempenho da separação cromatográfica foi avaliado pelos parâmetros de conformidade do sistema que representa um conjunto de testes que devem ser realizados para garantir que o sistema utilizado esteja habilitado a gerar resultados exatos e precisos. Para a técnica da cromatografia líquida, parâmetros como repetitividade ($CV \leq 1\%$ para $n \geq 5$), número de pratos da coluna ($N > 2000$), resolução ($R_s > 2$), fator de cauda ou assimetria ($TF \leq 2$), fator de retenção

($k > 2$) devem ser considerados (US FDA, 2004), sendo que no mínimo dois desses critérios são requeridos para garantir a conformidade do sistema (MARTINS, 2008).

3.2.2 Otimização da extração em LPME

Os parâmetros que afetam a extração LPME em três fases foram avaliados através do planejamento univariado: tipo de solvente orgânico, tempo de agitação, velocidade de agitação, pH da fase doadora, tipo e pH da fase aceptora, adição de sal e de modificadores orgânicos na fase doadora (amostra). As condições testadas foram:

- a) tipo de solvente orgânico: *n*-octanol, *n*-hexano, tolueno, éter *n*-hexílico, em diferentes proporções;
- b) avaliação do pH da fase doadora: 7,0; 9,0; 12,0; e 14,0;
- c) tempo de extração: 10, 20, 30, 40, 60 e 90 minutos;
- d) velocidade de agitação: 900, 1200, 1400, 1600 rpm;
- e) modo de agitação: diferentes tipos de agitadores magnéticos e agitação ultrassônica;
- f) seleção da fase aceptora: ácido clorídrico, ácido perclórico e ácido acético;
- g) avaliação do pH da fase aceptora: 2,0 e 4,0;
- h) adição de sal na fase doadora: 0,0; 0,5 e 1,0 g de cloreto de sódio;
- i) adição de modificador orgânico na fase doadora: etanol a 5, 10 e 20 % e metanol a 2, 5, 10, 15 e 20 %.

Estes estudos foram realizados em amostras de 1 mL de plasma humano “branco”, fortificado com 50 μL de padrão de FLU ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), em triplicta por ensaio.

3.2.3 Procedimento de preparação das amostras – LPME

O procedimento de preparo das amostras aplicando LPME foi realizado utilizando-se 1 mL de plasma adicionado de 100 μL de solução aquosa de hidróxido de sódio e o volume total foi completado com água purificada Milli-Q para 5 mL.

As extrações foram realizadas utilizando fibra de polipropileno de 7 cm de comprimento. Esta fibra foi fixada por uma das extremidades, com o apoio de uma microseringa, e imersa durante 10 segundos no solvente orgânico para que os poros fossem impregnados pelo líquido extrator. O excesso de solvente foi removido em banho ultra-sônico durante 15 segundos. Após a impregnação, 20 µL de fase acceptora foram introduzidos no interior da membrana com o auxílio de microseringa. Em seguida, o sistema foi mergulhado na solução doadora (matriz plasmática) e a extração iniciada sob agitação constante. Decorrido o tempo necessário, a fase acceptora foi recolhida do interior da membrana usando-se a outra microseringa, transferida para um béquer afunilado e adicionada com fase móvel q.s.p. 100 µL. Após agitação em vórtex, todo o volume foi transferido para *vial* de 200 µL, sendo 50 µL injetados no sistema cromatográfico.

3.2.4 Parâmetros de validação do método

Depois de estabelecer as condições cromatográficas e as condições de extração pra FLU, a validação do método foi realizada para garantir a credibilidade e segurança dos resultados. Este estudo foi realizado em coluna Lichrospher 60 RP – Select B, Merck® (125 mm x 4 mm x 5 µm), separação cromatográfica no modo isocrático com fase móvel tampão acetato de sódio 0,005 mol L⁻¹ pH 4,5: acetonitrila (50:50, v/v), na vazão de 0,6 mL min⁻¹, detector por fluorescência λ Ex/Em 230/290 nm e temperatura da coluna de 25° C.

Os parâmetros de validação foram avaliados segundo as recomendações preconizadas pela Anvisa, métodos bioanalíticos (BRASIL, 2003).

Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir e diferenciar precisamente um composto em presença de outros componentes tais como componentes da matriz.

A seletividade foi avaliada através da análise de amostras de plasma obtidas de seis indivíduos, sendo quatro amostras normais, uma hemolizada e uma lipêmica. O “*pool*” de plasma foi analisado sem adição dos analitos (plasma branco) e com

adição dos mesmos (plasma fortificado). Também foi verificado o comportamento cromatográfico de outros fármacos como diazepam, nordiazepam, cafeína e nicotina, nas condições otimizadas do método.

Linearidade

A linearidade, ou seja, a habilidade do método de originar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, foi determinada em amostras de “pool” de plasma branco fortificadas com FLU e NORFLU nas concentrações de 5, 10, 30, 50, 100, 200 e 500 ng mL⁻¹, além do padrão interno, venlafaxina (50 ng mL⁻¹).

A regressão linear simples, descrita pela equação $y = ax + b$, foi calculada através do quociente das áreas dos picos de FLU e NORFLU pela área do padrão interno, pelo método dos mínimos quadrados, onde a variável independente refere-se à concentração teórica dos analitos na matriz, e a correlação foi avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2). Na avaliação da linearidade estabeleceu-se também que os desvios dos valores nominais não poderiam ser superiores a 20% para o limite de quantificação e 15% para as outras concentrações da curva de calibração.

Limite de quantificação (LQ)

O LQ é a menor quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003), e este deve ser incluído na curva analítica (CHASIN et al., 1998).

O limite de quantificação (LQ) ou limite inferior de quantificação (LIQ) foi determinado pela concentração de FLU e NORFLU em plasma que forneceu uma relação sinal/ruído de 10, com relação ao branco de amostra, na região do tempo de retenção dos analitos. O LQ foi determinado por meio de fortificação de FLU e NORFLU em amostras de pool de plasma branco.

Precisão e exatidão

A precisão representa o grau de repetitividade nos resultados de análise de replicatas de mesmas amostras. Normalmente o cálculo da precisão é expresso em função do coeficiente de variação (CV%) ou estimativa do desvio padrão relativo (DPR) (LEITE, 2002).

A precisão foi determinada através de estudos intra e interensaios. As amostras de *pool* de plasma branco foram fortificadas nas concentrações de 20, 80 e 160 ng mL⁻¹ de FLU e NORFLU, e 50 ng mL⁻¹ VENLF. Cada concentração foi analisada em sextuplicada para análise intraensaio. Na análise interensaio (precisão intermediária) foram analisadas duplicatas/amostra por 3 dias consecutivos.

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor referente como verdadeiro (RIBANI et al., 2004). Geralmente é avaliada através do afastamento entre os valores esperados e obtidos, ou seja, pela medida da inexatidão (MAGALHÃES; BONATO, 2008).

A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. Este estudo foi realizado em amostras de “*pool*” de plasma branco fortificados com as mesmas concentrações do estudo de precisão, em sextuplicata por concentração.

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

Recuperação

Através da recuperação é possível verificar a eficiência de extração de um método analítico. É expressa como a porcentagem da quantidade conhecida do analito, obtida por comparação dos resultados analíticos de amostras branco acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com resultados analíticos de soluções padrão não extraídas (BRASIL, 2003).

A recuperação relativa foi calculada pela relação das respostas obtidas com amostras de plasma branco fortificadas com os analitos e o PI e extraídas com as resultantes de amostras de plasma branco, extraídas e fortificadas ao final de cada

processo, ou seja, nos extratos provenientes da LPME (solução aceptora). Foram analisadas as concentrações de FLU e NORFLU (10, 50 e 200 ng mL⁻¹), em triplicata/concentração.

Estabilidade dos analitos na solução aceptora ácida mantida no autoinjeter

Para este estudo foram preparadas soluções-padrão de FLU, NORFLU e VENLF na concentração de 50 ng mL⁻¹, em 20 µL de solução aceptora e 80 µL de fase móvel. Foi avaliada a estabilidade dos analitos em questão no injeter automático por 12 h, com leituras de duas em duas horas, a fim de verificar se o tempo em que as amostras ficam aguardando na fase aceptora ácida no autoinjeter pode afetar a estabilidade dos mesmos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Condições cromatográficas

A coluna utilizada para a otimização das variáveis da LPME na análise de FLU e NORFLU foi a Lichrospher 60 RP – Select B, MERCK® nas condições cromatográficas descritas em 3.2.1, demonstrou separação satisfatória dos analitos, com eficiência e resolução adequadas (FIGURA 11). Porém, nestas condições, não foi possível detectar teores abaixo de 100 ng mL^{-1} de fluoxetina no plasma.

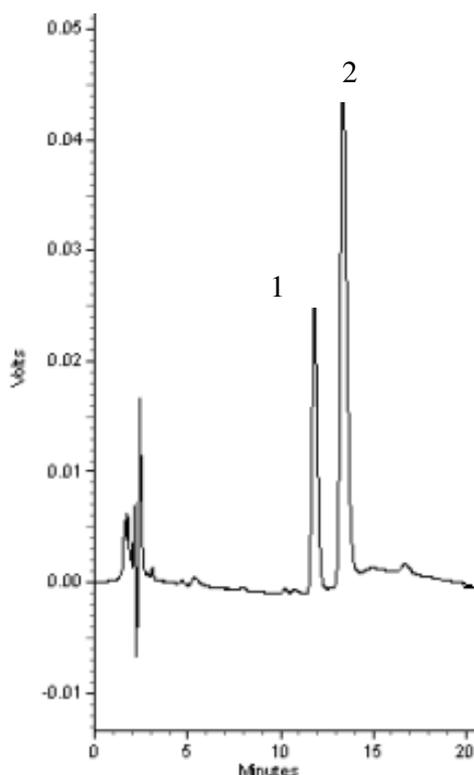


Figura 11 - Cromatograma de (1) norfluoxetina e (2) fluoxetina, soluções-padrão a 500 ng mL^{-1} , utilizando coluna Lichrospher® 60 RP – Select B, Merck® (250 mm x 4 mm x 5 μm) com fase móvel tampão ácido acético/acetato de sódio $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,5: acetonitrila (55:45, v/v), na vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, detector por absorção no ultravioleta a 230 nm. Temperatura da coluna $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência e detector por absorção no UV-VIS. Malfará et al. (2007) otimizaram as condições cromatográficas para monitorização terapêutica de antidepressivos tricíclicos e não-tricíclicos (fluoxetina, sertralina, paroxetina, citalopram, mirtazapina, moclobemida, duloxetina), após a extração líquido-líquido de amostras de plasma. Neste trabalho foi usada também a coluna Lichrospher 60 RP (C18) Select B, Merck® (250 mm x 4 mm x 5 µm) e a fase móvel constituída por uma mistura de 35 % de acetonitrila:metanol (92:8, v/v) e 65 % de tampão acetato de sódio 0,25 mol L⁻¹ pH 4,5, com vazão de 1,0 mL min⁻¹ em temperatura ambiente e detecção a 230 nm. Nestas condições os pesquisadores obtiveram separação adequada para os analitos.

Segundo Baumann (1996), os níveis plasmáticos da FLU são de 50 - 500 ng mL⁻¹ para as doses terapêuticas geralmente utilizadas. Nas condições cromatográficas previamente descritas, não foi possível quantificar valores inferiores a 100 ng mL⁻¹ de FLU e NORFLU em plasma. Visando melhorar a detectabilidade destes analitos, passou-se a avaliar o uso do detector por fluorescência.

A espectroscopia de fluorescência é utilizada como um método de detecção seletivo e sensível para os compostos que fluorescem (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006; MAIA; RATH; REYES, 2008). Com o uso deste detector observou-se o aumento da detectabilidade; porém, aumentou também a presença de picos interferentes com áreas superiores a 20 % da resposta para valores do LQ para FLU e NORFLU, usando a mesma coluna e fase móvel utilizada com o detector por absorção no UV.

Segundo a Anvisa (BRASIL, 2003), a resposta de picos interferentes no tempo de retenção do fármaco e do padrão interno deve ser inferiores a 20 % e 5 %, respectivamente. Por outro lado, a coluna começou apresentar sinais de desgaste. Sendo assim, dentre todas as condições avaliadas de coluna e de fase móvel citadas no Apêndice C, a melhor resposta foi obtida usando-se a coluna Lichrospher® 60 RP – Select B, Merck® (125 mm x 4 mm x 5 µm), separação cromatográfica no modo isocrático com fase móvel tampão acetato de sódio 0,005 mol L⁻¹ pH 4,5: acetonitrila (50:50, v/v), na vazão de 0,6 mL min⁻¹, detector por fluorescência λ Ex/Em 230/290 nm e temperatura da coluna de 25° C. Eficiência e resolução adequadas foram obtidas para análise de FLU e NORFLU e do padrão interno VENLF como mostra a Figura 12 e a Tabela 2. As demais condições testadas não apresentaram resolução satisfatória para os analitos em questão.

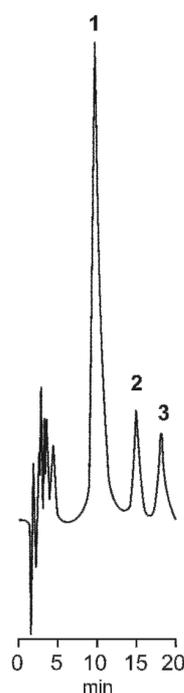


Figura 12 – Cromatograma de (1) venlafaxina, (2) norfluoxetina e (3) fluoxetina, soluções-padrão de 50 ng mL^{-1} , utilizando coluna Lichrospher 60 RP – Select B, Merck® (125 mm x 4 mm x 5 μm) com fase móvel tampão acetato de sódio $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5: acetonitrila (50:50, v/v), na vazão de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$, detector por fluorescência, comprimento de excitação 230 nm e de emissão 290 nm. Temperatura da coluna $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tabela 2 – Parâmetros de conformidade do sistema para análise cromatográfica da venlafaxina (VENLF), fluoxetina (FLU) e norfluoxetina (NORFLU).

Analito	Tempo de retenção	Área dos picos	Número de Pratos	Resolução	Assimetria 10% (T)	Fator de retenção
VENLF	10,05	11051865	3.863	0,00	1,83	8,77
NORFLU	15,20	1753043	17.043	3,60	1,19	14,38
FLU	18,29	2049640	11.847	1,95	1,40	17,55

A coluna Lichrospher® 60 RP – Select B, Merck® (125 mm x 3 mm x 5 μm) foi usada por Maya et al. 2000 na determinação de fluoxetina e diazepam (P.I.) em plasma usando HPLC-UV. A cromatografia líquida de alta eficiência combinada com detector por fluorescência, nos comprimentos de onda de 340/520 nm (Ex/Em), foi a técnica utilizada por Lacassie et al. (2000), além da GC, para a determinação de sete ISRS após extração líquido-líquido de amostra de soro humano.

A seleção do comprimento de onda de excitação (Ex) e emissão (Em) para detecção de FLU foi baseada no espectro de fluorescência (FIGURA 13) que mostra uma banda de emissão máxima em 290 nm quando excitado em 230 nm.

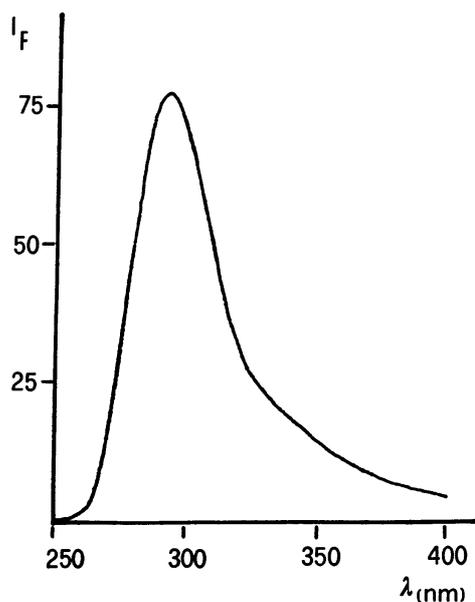


Figura 13 – Espectro de emissão de solução padrão de fluoxetina em metanol na concentração de 500 ng mL^{-1} (RAGGI et al., 1998).

Para garantir que as pequenas alterações nas variáveis experimentais não comprometessem as análises, a venlafaxina (FIGURA 14) foi selecionada como padrão interno ($\log P = 3,1$ e $pK_a = 9,7$), pois verificou-se que seu comportamento na extração era reprodutível. Nas condições experimentais otimizadas, o tempo de retenção relativo da FLU com este PI foi de $1,9 \pm 0,05$ e da NORFLU, de $1,5 \pm 0,03$. O tempo total de corrida foi de 21 minutos.

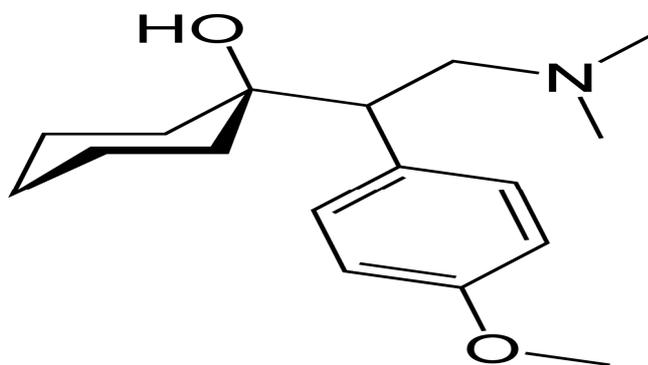


Figura 14 – Estrutura química da venlafaxina (P.I.)

4.2 Otimização da extração em LPME

O volume de amostra de 1 mL de plasma, diluído para 5 mL, e o tamanho da fibra 7 cm foram fixados tendo em vista o alcance de melhor detectabilidade e as condições materiais do Laboratório de Análises Toxicológicas, onde o projeto foi desenvolvido. O volume de solução aceptora, de 20 µL, foi selecionado por ser o máximo compatível com as dimensões da fibra usada. O tempo de impregnação e da remoção do solvente na fibra, 10 e 15 segundos, respectivamente, são citados na literatura (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJEGAARD 2004; MAGALHÃES; BONATO, 2008). Os demais parâmetros que interferem na LPME foram otimizados, usando-se a resposta em área de pico para FLU na concentração de 500 ng mL⁻¹ de plasma.

Foram testados previamente diferentes formatos de LPME. Para configuração em forma de “U” foram usadas duas seringas conectadas nas extremidades como suporte para a fibra (uma seringa para introduzir e a outra para remover a solução aceptora). Também nesta configuração, foi avaliado o uso de uma seringa numa das extremidades da fibra e uma agulha na outra, como descrito por Yang et al. 2007 (utilizando a mesma seringa para introduzir e remover a solução aceptora). Para a configuração em forma de haste (onde a fibra é introduzida verticalmente na amostra), uma das extremidades da fibra foi selada e apenas uma seringa foi utilizada na extremidade superior da fibra (suporte) como citado por De Santana; Bonato (2008). Realizados os testes, foi escolhido o formato na configuração em “U”, utilizando duas seringas, que possibilitou melhor extração, com menor variabilidade do volume coletado da solução aceptora (20 ± 1 µL), além de melhor repetitividade de resultados (FIGURA 15).

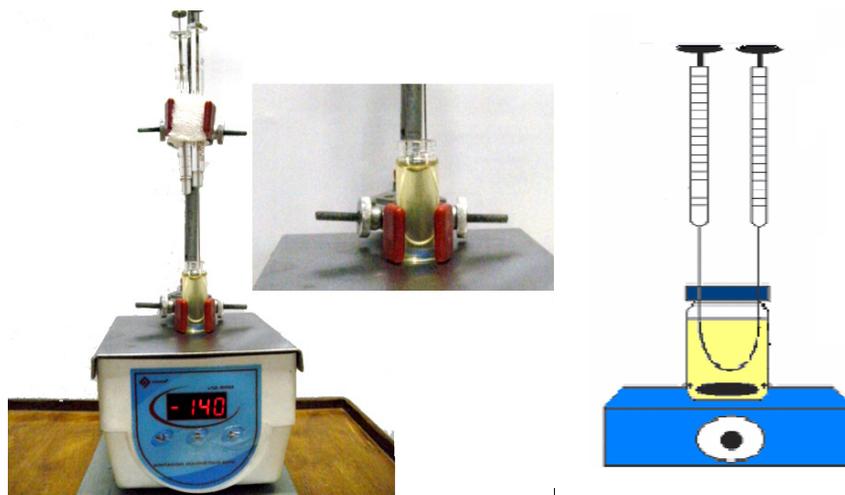


Figura 15 – Sistema LPME utilizado.

Solvente orgânico

A escolha do solvente é uma etapa crucial na técnica de extração em LPME; este parâmetro determina a eficiência da extração (FARAHANI et al., 2008). De forma geral, deve ser testada previamente a solubilidade do solvente, que deve ser imiscível em água, apresentar compatibilidade com a membrana, possuir baixa volatilidade e ter afinidade pelo analito (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004). A impregnação do solvente nos poros da parede da fibra deve ser completa, favorecendo assim a transferência dos analitos (DE SANTANA; DE OLIVEIRA; BONATO, 2005). Dentre os solventes avaliados (*n*-octanol, hexano, tolueno, éter *n*-hexílico, em diferentes proporções) o que originou melhor resultado foi o éter *n*-hexílico como demonstra a Figura 16. Além de possuir as características necessárias como líquido extrator também ofereceu maior extração do analito.

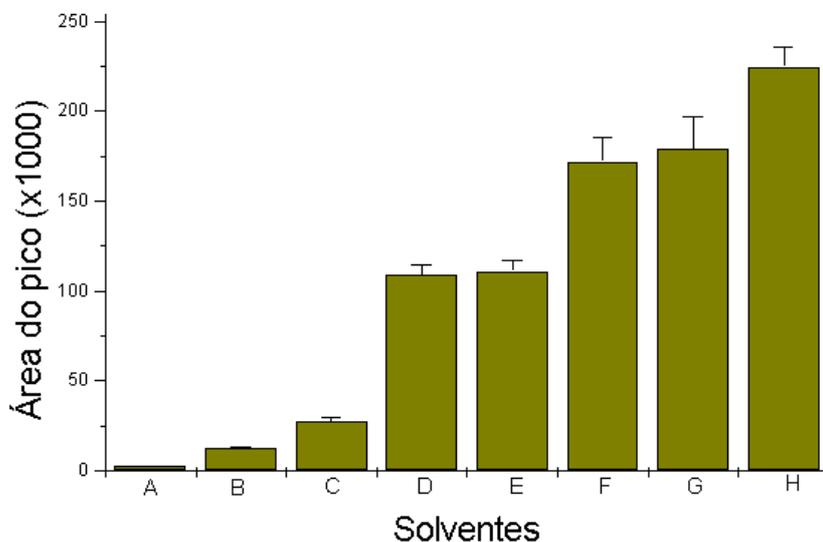


Figura 16 – Seleção do solvente orgânico para impregnação da fibra oca de polipropileno. (A) *n*-hexano: *n*-octanol (1:1), (B) tolueno: *n*-octanol (7:2), (C) *n*-hexano, (D) *n*-octanol, (E) *n*-hexano: *n*-octanol (8:2), (F) tolueno, (G) *n*-hexano: *n*-octanol (7:3) e (H) éter *n*-hexílico. Condições de análise: 1 mL de plasma, 100 µL de solução de NaOH 2 mol L⁻¹, 0,5 g de NaCl, tempo de extração 30 min, velocidade de agitação ~ 1000 rpm. Utilizando coluna Lichrospher® 60 RP – Select B, Merck® (250 mm x 4 mm x 5 µm) com fase móvel tampão acetato 0,25 mol L⁻¹ pH 5,5: acetonitrila (55:45, v/v), na vazão de 1,0 mL min⁻¹, detector por absorção no ultravioleta a 230 nm. Temperatura da coluna 25 °C.

Avaliação do pH da fase doadora

O ajuste do pH da amostra é importante na extração de analitos ácidos ou básicos, pois afeta a razão de distribuição e pode garantir fatores de enriquecimento e valores de recuperação mais elevados (PEDERSEN-BJEGAARD; RASMUSSEN, 2000).

Este ajuste é feito de modo que os analitos ionizáveis fiquem na sua forma não ionizada, reduzindo assim a solubilidade do analito na amostra aquosa. É necessário a obtenção de um alto coeficiente de partição, para favorecer a extração (PEDERSEN-BJEGAARD; RASMUSSEN, 2005).

Para este estudo, o volume de NaOH foi fixado em 100 µL, variando-se a concentração do mesmo (0,1, 2,0 e 5,0 mol L⁻¹) para o ajuste de pH 9,0, 12,0 e 14,0 respectivamente, por ser a fluoxetina um fármaco de caráter básico. Para obtenção de pH 7,0 não foi necessária a alcalinização da solução doadora (FIGURA 17).

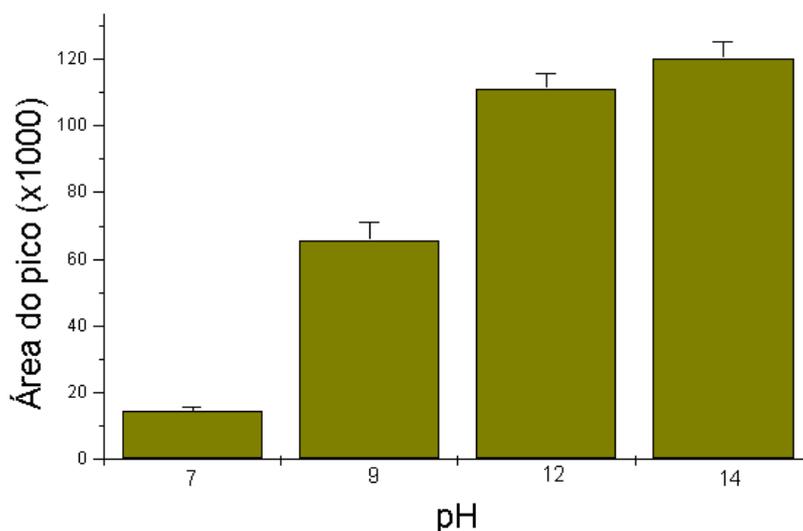


Figura 17 – Influência do pH da amostra para extração de fluoxetina por LPME. Condições de análise: 1 mL de plasma, 100 μL de solução de NaOH 2 mol L^{-1} , 0,5 g de NaCl, éter *n*-hexílico (solvente), tempo de extração 30 min, velocidade de agitação \sim 1000 rpm, 20 μL de HCl 20 mmol L^{-1} como fase aceptora. Utilizando coluna Lichrospher® 60 RP–Select B, Merck® (250 mm x 4 mm x 5) com fase móvel tampão acetato 0,25 mol L^{-1} pH 5,5: acetonitrila (55:45, v/v), na vazão de 1,0 mL min^{-1} , detector por absorção no ultravioleta a 230 nm. Temperatura da coluna 25 $^{\circ}\text{C}$.

O ajuste do pH da solução doadora nos experimentos posteriores foi feito utilizando 100 μL de hidróxido de sódio 5 mol L^{-1} (pH 14,0). Gatti et al. (2003) e Llerena et al. (2003), utilizando a LLE como preparo de amostra para determinação de FLU e NORFLU, alcalinizam a amostra com 500 μL de NaOH 0,5 mol L^{-1} , mas não citaram o valor do pH obtido. Empregando a LPME para determinação de vários antidepressivos, como os tricíclicos (amitriptilina, clomipramina, doxepina e trimipramina), os ISRS (citalopram, fluoxetina, fluvoxamina e paroxetina) e tetracíclicos (mianserina), Halvorsen et al. (2003) alcalinizaram a amostra com 100 μL de NaOH 2 mol L^{-1} , e também não citaram o valor do pH obtido.

Tempo de extração

O processo de transferência de massa da extração em LPME é dependente do tempo de exposição da fibra na solução doadora (amostra). Por ser uma técnica de equilíbrio (não exaustiva), a recuperação do analito aumenta proporcionalmente

ao tempo de extração até atingir uma situação de platô, o que significa que o equilíbrio foi atingido entre as fases (ZHAO; LEE, 2001; RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004; DE OLIVEIRA et al., 2008). Para obter maior aplicabilidade da técnica, a extração é realizada, muitas vezes, em condições de não-equilíbrio, visando a diminuição do tempo de extração (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004; FARAHANI et al., 2008). A Figura 18 mostra os resultados obtidos para esta variável.

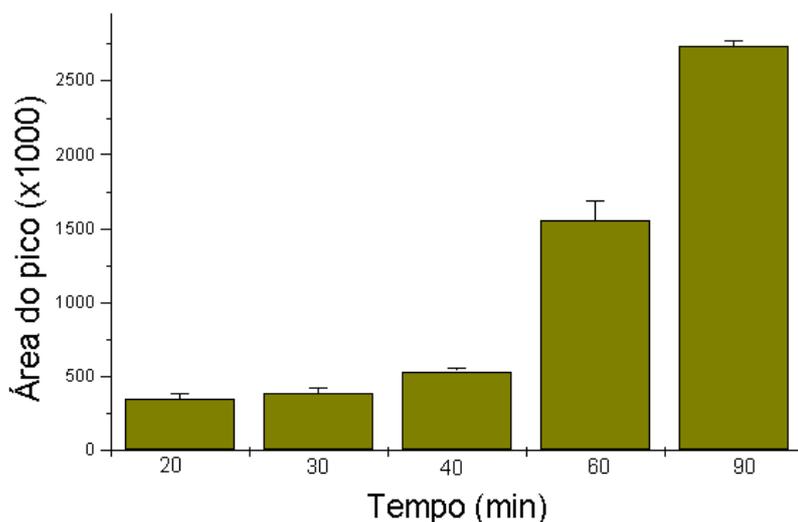


Figura 18 – Influência do tempo de extração na extração de fluoxetina por LPME. Condições de análise: 1 mL de plasma, 100 μL de solução de NaOH 5 mol L^{-1} , éter *n*-hexílico (solvente), velocidade de agitação ~ 1000 rpm, 20 μL de HCl 20 mmol L^{-1} como fase aceptora. Utilizando coluna Lichrospher[®] 60 RP-Select B, Merck[®] (250 mm x 4 mm x 5) com fase móvel tampão acetato 0,25 mol L^{-1} pH 5,5: acetonitrila (55:45, v/v), na vazão de 1,0 mL min^{-1} , detector por absorção no ultravioleta a 230 nm. Temperatura da coluna 25 $^{\circ}\text{C}$.

O tempo de agitação foi avaliado no intervalo de 20 a 90 minutos, sendo selecionado para as extrações posteriores o de 40 minutos, suficiente para obtenção de LQ de 5 ng mL^{-1} no uso de HPLC-FL.

Velocidade de agitação

A cinética de extração pode ser acelerada pela agitação da amostra, que facilita a difusão dos analitos da fase doadora, passando pela solução extratora,

para a solução aceptora. Ocorre aumento da eficiência da extração e redução do tempo necessário para a mesma (LORD; PAWLINSZYN, 2000; KHALILI-ZANJANI et al., 2008).

Examinando um intervalo de 900 a 1600 rpm, conforme mostra a Figura 19, a velocidade de agitação selecionada foi de 1400 rpm. O aumento desta velocidade introduziu maior imprecisão nas medições.

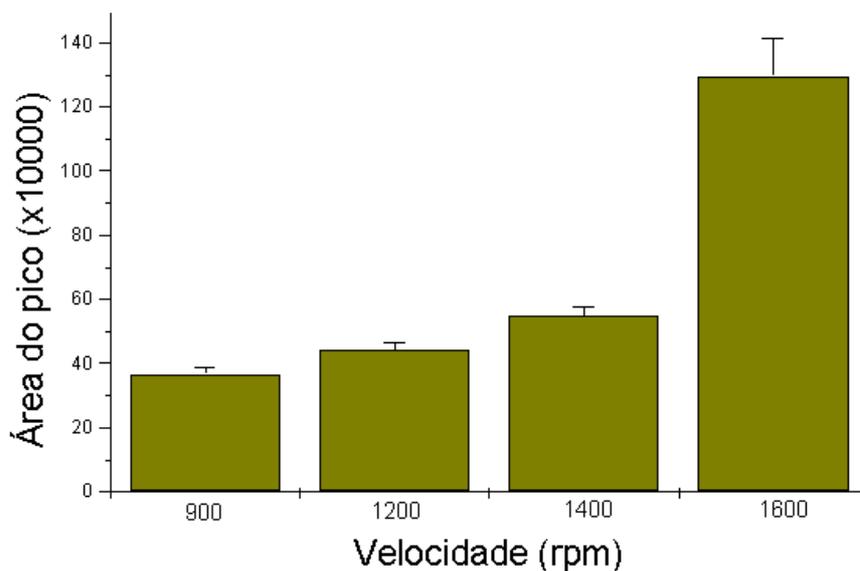


Figura 19 – Influência da velocidade de extração. Condições de análise: 1 mL de plasma, 100 μL de solução de NaOH 5 mol L^{-1} , éter *n*-hexílico (solvente), tempo extração 40 min, 20 μL de HCl 20 mmol L^{-1} como fase aceptora. Utilizando coluna Lichrospher[®] 60 RP – Select B, Merck[®] (250 mm x 4 mm x 5) com fase móvel tampão acetato $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,5: acetonitrila (55:45, v/v), na vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, detector por absorção no ultravioleta a 230 nm. Temperatura da coluna $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Shen; Lee (2002) observaram que na SDME a agitação elevada possibilita a perda da gota suspensa na agulha, tornando a quantificação dos analitos imprecisa. Isto não acontece na LPME, visto que a solução aceptora é introduzida no interior da fibra, tornando possível o uso de velocidades mais elevadas.

Modo de agitação da amostra

Comumente as amostras são agitadas através de vibração (plataforma agitadora ou ultrassom) e agitadores magnéticos. Nesta pesquisa, comparando o uso de ultrassom com os agitadores magnéticos, estes resultaram em maior precisão nas medições. Também foi necessário selecionar os agitadores magnéticos que fornecessem resposta similar para as replicatas de amostra, visto a dificuldade de ser fixada a velocidade de agitação correta com base no seletor dos mesmos. Para isto, foram selecionados três agitadores para possibilitar a extração simultânea de três amostras, sendo dois da Quimis[®] (um com controle de agitação digital em rpm e o outro não) e um da Nova Técnica[®] sem controle de agitação digital.

As barras magnéticas podem provocar contaminação cruzada das amostras bem como a formação de bolhas de ar que podem aderir na superfície da fibra, acelerando a evaporação do solvente (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). Este inconveniente foi evitado mantendo uma agitação moderada e constante para todas as amostras durante o procedimento.

Seleção da fase aceptora

Utilizando o sistema LPME de três fases direcionado para extração de fármacos básicos, o pH da solução aceptora deverá estar na faixa ácida garantindo assim a protonação dos analitos, evitando perdas do mesmo para solução doadora (UGLAND; KROGH; REUBSAET, 2003; DE OLIVEIRA et al., 2008). Dentre os ácidos avaliados, o ácido clorídrico 20 mmol L⁻¹ foi o que apresentou maior recuperação dos analitos conforme demonstra a Figura 20.

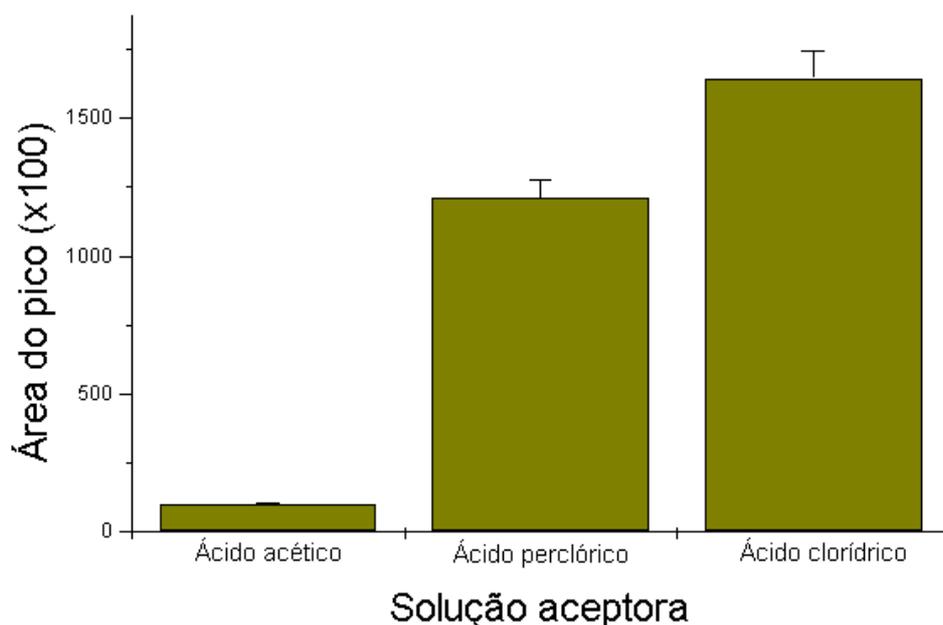


Figura 20 – Seleção do tipo de solução acceptora para extração de fluoxetina por LPME. Os ácidos acético, perclórico e clorídrico foram testados na concentração de 100, 10 e 20 mmol L⁻¹, respectivamente. Condições de análise: 1mL de plasma, 100 µL de solução de NaOH 5 mol L⁻¹, 0,5 g de NaCl, éter *n*-hexílico (solvente), tempo de extração 40 min, velocidade de agitação 1400 rpm. Utilizando coluna Lichrospher® 60 RP – Select B, Merck® (250 mm x 4 mm x 5) com fase móvel tampão 0,25 mol L⁻¹ pH 5,5: acetonitrila (55:45, v/v), na vazão de 1,0 mL min⁻¹, detector por absorção no ultravioleta a 230 nm. Temperatura da coluna 25 °C.

Avaliação do pH da fase acceptora

Os ácidos fortes resultam em melhores valores de recuperação quando comparados com soluções acceptoras contendo ácidos fracos no sistema LPME de três fases. Esta melhora é conferida através de menor pH e eficaz protonação dos analitos obtidos no emprego dessas soluções (PEDERSEN-BJEGAARD; RASMUSSEN, 2000; DE OLIVEIRA et al., 2008). Deste modo, foi selecionado o ácido clorídrico, no pH 2,0, (FIGURA 21). Este ácido é o mais citado na literatura para uso como solução acceptora (HALVORSEN; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2001; HALVORSEN et al., 2003; YANG et al., 2007).

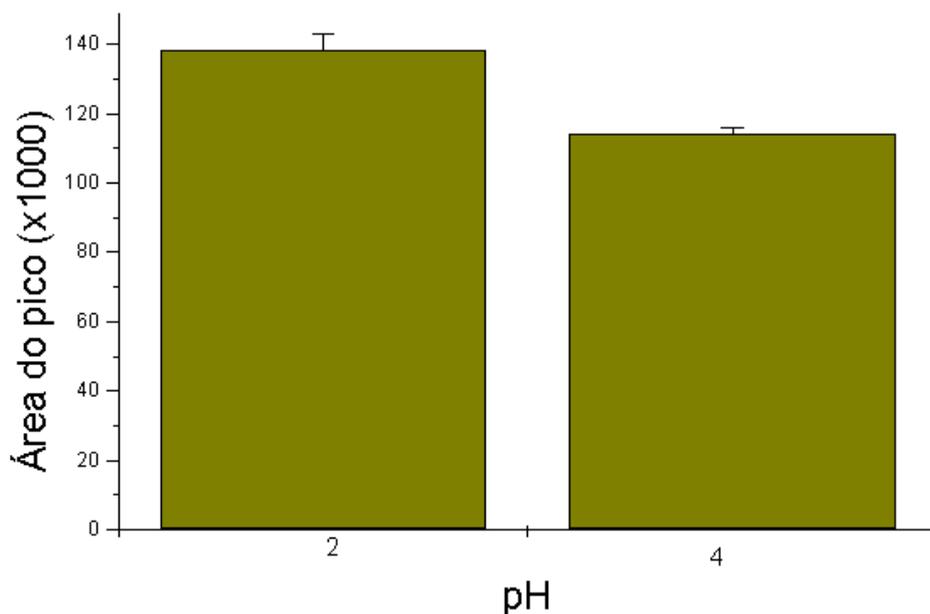


Figura 21 – Influência do pH ácido da solução acceptora ($\text{HCl } 20 \text{ e } 2 \text{ mmol L}^{-1}$). Condições de análise: 1 mL de plasma, 100 μL de solução de $\text{NaOH } 5 \text{ mol L}^{-1}$, 0,5 g de NaCl , éter *n*-hexílico (solvente), tempo de extração 40 min, velocidade de agitação 1400 rpm, 20 μL de $\text{HCl } 20 \text{ mmol L}^{-1}$ como fase acceptora. Utilizando coluna Lichrospher® 60 RP – Select B, Merck® (250 mm x 4 mm x 5) com fase móvel tampão acetato 0,25 mol L^{-1} pH 5,5: acetonitrila (55:45, v/v), na vazão de 1,0 mL min^{-1} , detector por absorção no ultravioleta a 230 nm. Temperatura da coluna 25 °C.

Adição de sal na fase doadora

A adição de sais inorgânicos na solução da amostra pode promover extrações eficientes devido o efeito “salting out” (KHALILI-ZANJANI et al., 2008).

O uso destes na fase doadora pode diminuir a solubilidade do analito na solução aquosa (amostra), o que vai depender da natureza do analito. O uso do sal pode melhorar, não influenciar ou até limitar a extração (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). Nesta pesquisa foi utilizado o cloreto de sódio, em diferentes quantidades, e os resultados demonstraram não haver justificativa para o uso do mesmo, como denota a Figura 22.

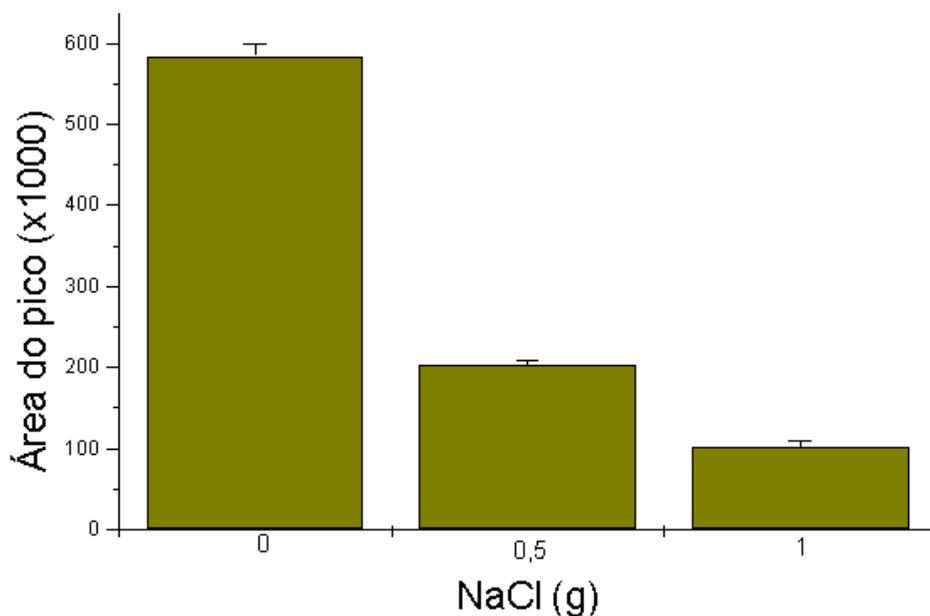


Figura 22 – Influência da adição de cloreto de sódio em diferentes quantidades. Condições de análise: 1 mL de plasma, 100 μL de solução de NaOH 5 mol L^{-1} , éter *n*-hexílico (solvente), tempo de extração 40 min, velocidade de agitação 1400 rpm, solução aceptora 20 μL HCl 20 mmol L^{-1} . Utilizando coluna Lichrospher[®] 60 RP –Select B, Merck[®] (250 mm x 4 mm x 5) com fase móvel tampão acetato 0,25 mol L^{-1} pH 5,5: acetonitrila (55:45, v/v), na vazão de 1,0 mL min^{-1} , detector por absorção no ultravioleta a 230 nm. Temperatura da coluna 25 $^{\circ}\text{C}$.

Adição de solvente orgânico

As interações fármaco-proteínas geralmente são responsáveis pelos baixos valores de recuperação. A fluoxetina apresenta alta ligação às proteínas plasmáticas, em torno de 94% (SCIPPA; OLIVEIRA, 2006). Devido a este fato, é comum a adição de um solvente orgânico na solução doadora (amostra), a fim de suprimir as ligações fármaco-proteína (DE OLIVEIRA et al., 2008).

Nesta pesquisa foram testados o etanol 5, 10 e 20 % e o metanol 2, 5, 10, 15 e 20 %, os mais citados na literatura (HALVERSEN; PEDERSEN-BJEGAARD; RASMUSSEN, 2001; PEDERSEN-BJEGAARD; RASMUSSEN, 2000; MAGALHÃES; BONATO, 2008). Dos álcoois testados, o metanol apresentou a melhor resposta (aumento na área em torno de 16,6 vezes). Este álcool possui a capacidade de romper interações hidrofóbicas e polares entre o analito e as proteínas (UGLAND; KROGH; RASMUSSEN, 2000; DE SANTANA; DE OLIVEIRA; BONATO, 2005). Por

outro lado observou-se que a adição de metanol interferia na precisão da leitura de replicatas da amostra. Talvez este álcool afete a distribuição do analito entre a fase aquosa (amostra) e o solvente orgânico, reduzindo a repetitividade da extração, Assim, optou-se por não utilizar metanol na solução doadora nos experimentos posteriores.

4.3 Parâmetros de validação do método

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra é necessário que o mesmo seja avaliado através da validação (RIBANI et al., 2004). A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade e recuperação adequadas à análise (BRASIL, 2003).

Seletividade

A Tabela 3 demonstra não haver interferência nos tempos de retenção dos fármacos testados com relação aos dos analitos.

Tabela 3 – Analitos e outros fármacos testados na avaliação da seletividade do método.

ANALITO	TEMPO DE RETENÇÃO (minutos)
Venlafaxina	10,8
Norfluoxetina	16,2
Fluoxetina	19,3
Diazepam	ND
Nordiazepam	ND
Cafeína	ND
Nicotina	ND

ND = não detectado o analito nas condições otimizadas de análise.

As amostras de plasma branco, lipêmico ou hemolizado, extraídas por LPME e cromatografadas, não mostraram qualquer interferência na região de eluição dos analitos, o que torna o método apropriado para determinação e quantificação de FLU e NORFLU em plasma (FIGURA 23).

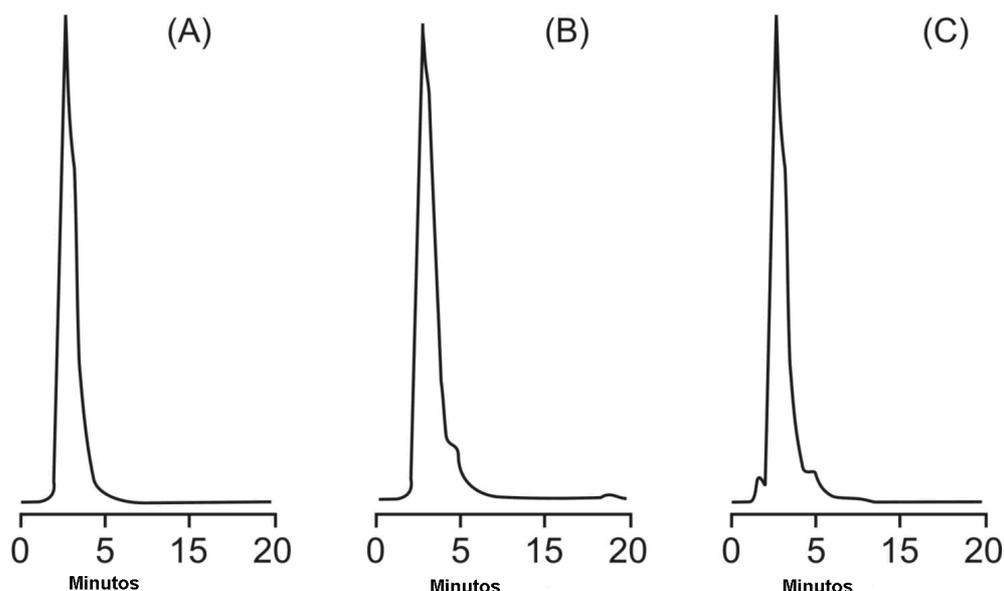


Figura 23 – Amostras de (A) plasma branco, (B) lipêmico e (C) hemolizado extraídas por LPME utilizando coluna Lichrospher® 60 RP – Select B, Merck® (125 mm x 4 mm x 5 µm) com fase móvel tampão acetato 0,005 mol L⁻¹ pH 4,5: acetonitrila (50:50, v/v), na vazão de 0,6 mL min⁻¹, detector por absorção no fluorescência, comprimento de excitação 230 nm e de emissão 290 nm. Temperatura da coluna 25°C.

A Figura 24 mostra cromatogramas de amostras de plasma extraídas por LLE com *n*-hexano: álcool isoamílico (99:1, v/v) de acordo com o método de Malfará et al. (2007) e por LPME, ambas analisadas por HPLC, comprovando que o processo miniaturizado de LPME origina extratos bastante limpos, livres de interferentes da matriz plasmática, como referido anteriormente por Pedersen-Bjergaard; Rasmussen (1999) e Pedersen-Bjergaard; Rasmussen (2008).

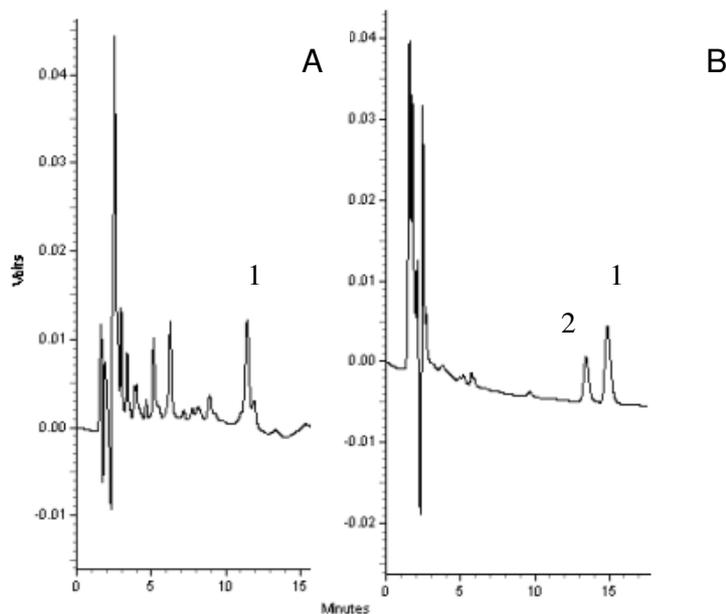


Figura 24 – Amostras de plasma fortificadas com 500 ng mL^{-1} de fluoxetina e extraídas por (A) LLE, utilizando *n*-hexano: álcool isoamílico (99:1, v/v) como solvente e 200 mg de NaCl e (B) LPME, sendo (1) fluoxetina e (2) norfluoxetina analisadas por HPLC-UV. Condições de análise: coluna Lichrospher® 60 RP Select B, Merck® (250 mm x 4 mm x 5 μm) com fase móvel tampão acetato $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,5: acetonitrila (55:45, v/v), na vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, detector por absorção no ultravioleta a 230 nm. Temperatura da coluna $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Linearidade

A linearidade foi avaliada a partir da construção de curvas analíticas, as quais estabelecem a relação entre a concentração do analito e a resposta do instrumento. Foram realizadas análises de uma série de calibradores preparados a partir de soluções de diferentes concentrações, dentro da faixa de interesse, utilizando amostra fortificada. Segundo Anvisa (BRASIL, 2003), deve-se analisar amostras extraídas da matriz utilizando no mínimo seis concentrações diferentes. Embora alguns procedimentos analíticos possam requerer calibração não-linear, normalmente usa-se o modelo linear, onde a variável independente (eixo x) é a concentração e a variável dependente (eixo y) é a resposta (BRAGGIO et al., 1996). Neste trabalho, a resposta foi fornecida pela área relativa (área de FLU ou NORFLU / área do P.I.).

As Figuras 25 e 26 ilustram a linearidade. Cada ponto corresponde à média dos valores obtidos na análise de seis replicatas. Os dados apresentados evidenciam linearidade satisfatória no intervalo selecionado, com coeficientes de determinação de 0,9999 e de 0,9962 para FLU e NORFLU respectivamente.

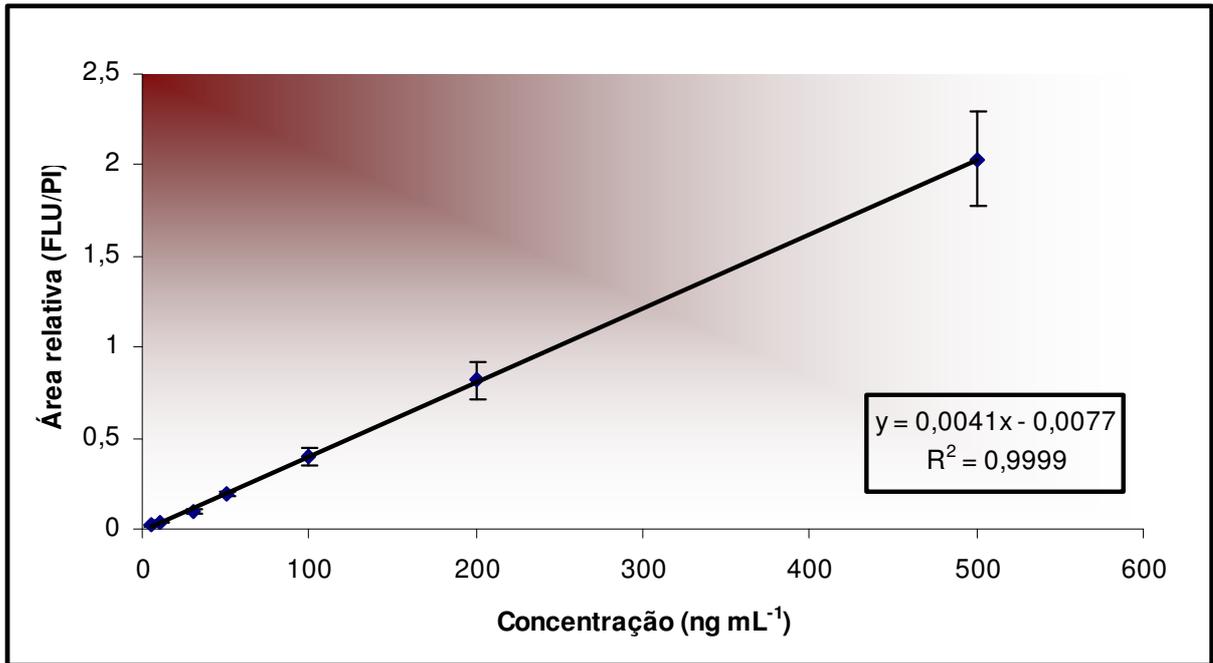


Figura 25 – Curva analítica para fluoxetina (FLU), em amostras de plasma fortificadas nas concentrações de 5 a 500 ng mL⁻¹, extraídas por LPME.

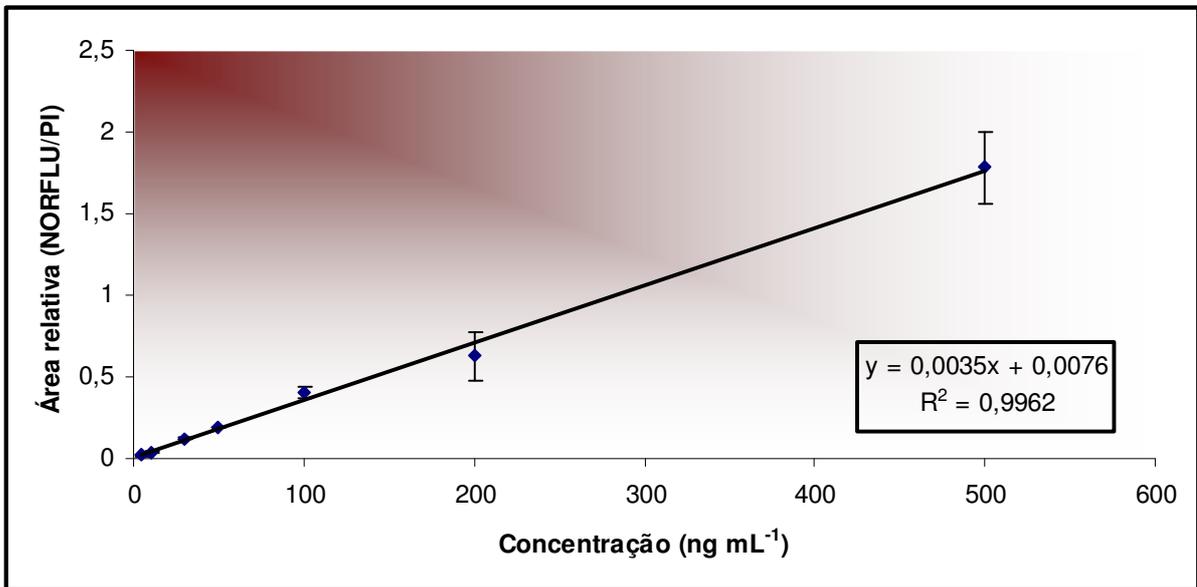


Figura 26 – Curva analítica para norfluoxetina (NORFLU), em amostras de plasma fortificadas nas concentrações de 5 a 500 ng mL⁻¹, extraídas por LPME.

Nessas faixas de concentração é possível analisar amostras de pacientes tratados com diferentes doses de FLU (usualmente de 20 a 80 mg dia⁻¹) ou mesmo doses subterapêuticas (< 20 mg dia⁻¹), em estudos de biodisponibilidade.

Faixa de linearidade semelhante à desta pesquisa (de 10 a 500 ng mL⁻¹) foi relatada por Fernandes et al. (2006) usando a SBSE e HPLC-MS para análise de FLU em plasma. Usando a LLE e detecção por HPLC-UV, intervalos entre 5 e 50 ng mL⁻¹ (GATTI et al., 2003) e 100 a 1600 nmol L⁻¹ (LLERENA et al., 2003) são relatadas para análise de FLU em plasma. Com o detector por fluorescência acoplado à HPLC, intervalo mais estreito (1 a 39 ng mL⁻¹) foi citado por Vlase; Imre; Leucuta (2005), também para análise de FLU e NORFLU em plasma.

Limite de quantificação (LQ)

Para o método proposto, a menor concentração quantificável do analito foi de 5 ng mL⁻¹ para FLU e NORFLU com relação sinal/ruído = 10 e % CV de 9,4 e 14,4 respectivamente (sextuplicata de amostra). Coeficientes de variação inferiores a 20 % são aceitos para o estabelecimento do LQ em métodos bioanalíticos (SHAH et al., 1992; BRASIL, 2003).

Precisão

A precisão e a exatidão determinam o erro da análise e são parâmetros muito importantes para avaliação do desempenho do método analítico. A precisão descreve a proximidade entre as várias medidas efetuadas em uma mesma amostra. Essas medidas podem ser simultâneas (precisão intraensaio) ou intercaladas (precisão interensaio)

Para avaliar a precisão intra e interensaio foram analisadas amostras de plasma fortificadas em três diferentes concentrações 20 (baixa), 80 (média) e 160 ng mL⁻¹ (alta) de FLU e NORFLU como mostra a Tabela 4.

Tabela 4 – Coeficientes de variação (% CV) obtidos para o estudo da precisão do método para fluoxetina (FLU) e norfluoxetina (NORFLU).

Concentração (ng mL ⁻¹)	% CV			
	Intraensaio*		Interensaio**	
	FLU	NORFLU	FLU	NORFLU
20	4,9	5,4	1,5	4,0
80	3,6	4,0	3,0	10,0
160	2,1	3,2	7,5	13,0

* seis replicatas por concentração; ** duplicatas de amostra por concentração e por dia (3 dias).

Todos os valores de coeficiente de variação são aceitos pela Anvisa (BRASIL, 2003). Vlase; Imre; Leucuta (2005), descreveram valores de % CV para FLU de até 6,73 (precisão intraensaio), 14,68 (precisão interensaio) e para NORFLU 7,14 (intraensaio) e 8,25 (interensaio), utilizando a LLE por HPLC-FL.

Exatidão

A Tabela 5 mostra os resultados (em %) obtidos no estudo da exatidão do método.

Tabela 5 – Exatidão do método de análise de fluoxetina (FLU) e norfluoxetina (NORFLU).

Concentração (ng mL ⁻¹)	Exatidão (%)	
	FLU	NORFLU
20	104,2	114,5
80	109,3	109,0
160	110,1	118,6

Os valores obtidos são considerados satisfatórios, pois os mesmos encontram-se dentro do intervalo recomendado pela Anvisa (80 – 120%) (BRASIL, 2003).

Recuperação

É importante salientar que a recuperação deve ser verificada em várias concentrações (baixa, média e alta), uma vez que esta pode variar bastante com concentrações baixas (LANÇAS, 2004). O estudo de recuperação foi realizado utilizando três níveis de concentrações, em triplicata cada. Estes resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Porcentual de recuperação relativa do método para análise de fluoxetina (FLU) e norfluoxetina (NORFLU).

Concentração (ng mL ⁻¹)	% Recuperação relativa	
	FLU	NORFLU
10	76,9	52,0
50	70,6	67,5
200	65,4	59,6
Média ± DP	70,9 ± 5,8	59,7 ± 7,8

A LPME é uma técnica não exaustiva, ou seja, o analito é transferido de forma gradativa para solução aceptora até que sua concentração fique constante. (HO; PEDERSEN-BJEGAARD; RASMUSSEN, 2002; PEDERSEN-BJEGAARD; RASMUSEN, 2008). Deste modo, é comum que as recuperações das técnicas não-exaustivas apresentem valores menores comparados com as técnicas exaustivas. Relatos na literatura registram valores de recuperação em LPME entre 10 – 90% (PEDERSEN-BJEGAARD et al., 2005).

Os valores médios de recuperação relativa encontrados foram de 59,7 e 70,9% respectivamente para NORFLU e FLU, e são valores satisfatórios para técnicas de microextração (LORD; PAWLISZYN, 2000). Fontanille et al. (1997), encontraram recuperação média de 96,5% para FLU e 73,6% para NORFLU, utilizando LLE como procedimento de extração. Halvorsen et al. (2003), citaram valores de recuperação para FLU de 31 % utilizando LPME na determinação simultânea de 9 antidepressivos (amitriptilina, clomipramina, doxepina, imipramina, citalopram, fluoxetina, mianserina, fluvoxamina e paroxetina).

A LPME é uma técnica que possibilita valores relativamente altos de enriquecimento, e permite a injeção direta da solução acceptora no sistema cromatográfico (PEDERSEN-BJEGAARD; RASMUSSEN, 2008).

Geralmente os metabólitos desmetilados são compostos mais polares que apresentam recuperação inferior ao fármaco de origem, em condições otimizadas para este. Além disso, a fase de extração (neste caso, éter *n*-hexílico) beneficia os compostos com menor polaridade (ZHAINAGHI, 2001), o que poderia explicar os valores mais baixos de recuperação de NORFLU comparados aos da FLU.

Estudo de estabilidade dos analitos na solução acceptora ácida, mantida no autoinjeter

A Figura 27 mostra os resultados do estudo de estabilidade da FLU e NORFLU na solução acceptora ácida, mantida no autoinjeter do cromatógrafo (leituras a cada duas horas num tempo total de doze horas).

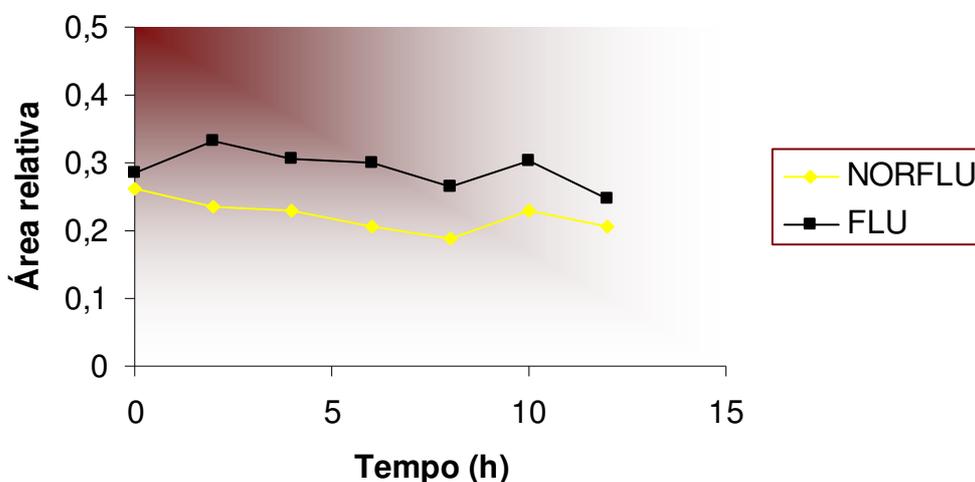


Figura 27 - Estabilidade dos analitos na solução acceptora ácida, mantida no autoinjeter, utilizando soluções-padrão de norfluoxetina e fluoxetina e do padrão interno, na concentração de 50 ng mL⁻¹.

Os coeficientes de variação entre as injeções, foram de 12,6% e de 11,5% respectivamente para FLU e NORFLU no intervalo de tempo considerado.

4.4 Aplicação do método

Os níveis plasmáticos de FLU e NORFLU nos 12 voluntários são mostrados na Tabela 7. Foi feita uma curva de calibração na mesma semana em que as amostras foram analisadas.

Largas variações interindividuais nos valores plasmáticos são relatadas no uso de ISRS frente à mesma dose ingerida por dia (BALDESSARINI, 2007), fato também verificado nos pacientes avaliados nesta pesquisa.

Tabela 7 - Concentrações plasmáticas (ng mL^{-1}) de fluoxetina (FLU) e norfluoxetina (NORFLU) em 12 pacientes sob uso de fluoxetina.

<i>Paciente</i>	<i>mg dia⁻¹</i>	<i>Idade (anos)</i>	<i>Tempo de uso (meses)</i>	<i>FLU</i>	<i>NORFLU</i>
01	20	50	12	42,6	58,4
02	20	23	5	61,7	87,9
03	20	43	60	48,9	142,7
04	20	25	9	37,1	122,5
05	20	60	60	53,2	95,0
06	25	56	NI	39,2	54,4
07	30	36	3	149,7	68,4
08	40	42	120	63,3	101,8
09	40	66	12	157,5	187,6
10	40	25	0,5	206,0	125,6
11	60	52	3	199,2	184,2
12	80	33	12	208,7	234,2

NI = não informado

Muitos fatores podem influenciar na resposta do paciente a uma substância, como a idade, distúrbios patológicos que comprometem a eliminação do fármaco, bem como a interação medicamentosa e alimentar, além de fatores genéticos (ZAINAGHI, 2001).

A Figura 28 mostra cromatograma de amostra de um paciente que ingeria 40 mg dia⁻¹ de fluoxetina. Concentrações plasmáticas de FLU e NORFLU variando entre 15 e 526 ng mL⁻¹ e de 32 a 277 ng mL⁻¹, respectivamente, são citadas na literatura, quando da ingestão de 20 a 60 mg dia⁻¹ de fluoxetina, porém as amostras não foram coletadas sempre no período da concentração plasmática mínima (RAGGI et al., 1998; DJORDJERVIC et al., 2005; SANTOS-NETO et al., 2008).

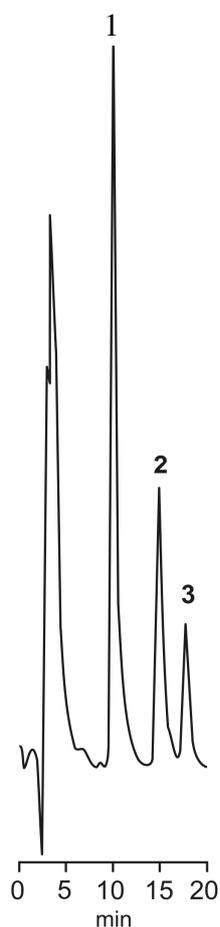


Figura 28 – Amostra de paciente sob tratamento com 40 mg dia⁻¹ fluoxetina. Sendo (1) venlafaxina, (2) norfluoxetina e (3) fluoxetina, extraída por LPME nas seguintes condições de análise: 1 mL de plasma, 100 µL NaOH 5 mol L⁻¹, éter n-hexílico (solvente), tempo de extração 40 min, velocidade de agitação 1400 rpm, solução aceptora 20 µL HCl 20 mmol L⁻¹. Utilizando coluna Lichrospher[®] RP-Select B, Merck[®] (250 mm x 4 mm x 5µm) com fase móvel tampão acetato 0,005 mol L⁻¹ pH 4,5: acetonitrila (50:50, v/v), na vazão de 0,6 mL min⁻¹, detector por absorção no fluorescência, comprimento de excitação 230 nm e de emissão 290 nm. Temperatura da coluna 25 °C.

A FLU apresenta farmacocinética não linear, indicada pelo aumento desproporcional nas concentrações sanguíneas após doses escalonadas. Em doses múltiplas ocorre o prolongamento da meia-vida e redução do *clearance*, quando comparados com dose única (HIEMKE; HÄRTTER, 2000). Não é estabelecida com segurança a faixa terapêutica ótima para a FLU, isto é, quais os valores de concentração plasmática se relacionam melhor à resposta clínica do paciente. Valores de 50 e 500 ng mL⁻¹ são citados , considerando-se as diferentes posologias do fármaco (BAUMANN, 1996).

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram apresentados e discutidos os resultados obtidos no desenvolvimento de um método utilizando a microextração em fase líquida (LPME) no preparo de amostra de plasma para análise cromatográfica em fase líquida, com detector por fluorescência, de fluoxetina e seu metabólito ativo, a norfluoxetina, visando sua aplicação na monitorização terapêutica de pacientes que fazem uso do fármaco.

Os resultados desta pesquisa permitem concluir que:

- ❖ As condições cromatográficas otimizadas para análise cromatográfica de fluoxetina e norfluoxetina, usando a venlafaxina como padrão interno – coluna de sílica octadecila Lichrospher 60 RP – Select B (125 mm x 4 mm x 5 μ m), fase móvel tampão acetato de sódio 0,005 mol L⁻¹ pH 4,5: acetonitrila (50:50), na vazão de 0,6 mL min⁻¹ e detector por fluorescência λ Ex/Em 230/290 nm –, resultaram em resolução e eficiência satisfatórias, permitindo a análise cromatográfica de uma amostra em 21 minutos.
- ❖ Utilizando a configuração no formato de “U” do sistema de microextração em fase líquida de três fases em fibra oca de polipropileno de 7 cm, os resultados das variáveis da técnica avaliados permitem concluir que o tipo de solvente extrator, o tempo de extração e a velocidade de agitação da amostra, assim como do pH da amostra e do tipo da fase aceptora, afetam fortemente a extração do analito. A adição de sal na amostra afeta negativamente a extração e adição de solvente orgânico na fase doadora, metanol, aumenta a extração, porém, introduz maior variabilidade nos resultados. Assim, pode-se afirmar que a otimização das variáveis da LPME para o analito pretendido é etapa de fundamental importância antes de sua aplicação em amostras reais, uma vez que diferenças significativas na quantidade extraída do analito são observadas.

- ❖ O método desenvolvido e validado para análise de FLU e NORFLU em plasma mostrou detectabilidade elevada (5 ng mL^{-1}), linearidade num amplo intervalo de concentrações ($5\text{-}500 \text{ ng mL}^{-1}$), precisão intra e interensaio satisfatória (CV entre 1,5 a 13%), exatidão e recuperação de acordo com valores aceitos internacionalmente para método bioanalítico.

- ❖ O método de análise de FLU e NORFLU em plasma por LPME e cromatografia líquida de alta eficiência com detector por fluorescência resultou em excelente limpeza da amostra e elevada seletividade, sendo simples, econômico, relativamente rápido, e a técnica de extração permitiu o pré-enriquecimento dos analitos.

- ❖ O método desenvolvido e validado foi aplicado na análise de FLU e NORFLU em amostras de 12 pacientes em uso do fármaco e demonstrou sua viabilidade para uso em análises rotineiras de monitorização terapêutica.

- ❖ Por outro lado, visto seu baixo LQ e o amplo intervalo linear, este método também mostra características para emprego em estudos de farmacocinética, mesmo com doses subterapêuticas, assim como em estudos de bioequivalência e biodisponibilidade de novas formas ou formulações do medicamento. Ainda é promissor para o diagnóstico de intoxicações, podendo a amostra ser diluída com plasma livre de fármacos, se o resultado extrapolar o limite superior de linearidade estabelecido no método.

REFERÊNCIAS

ADDISON, R. S.; FRANKLIN, M. E.; HOOPER, W. D. Sensitive, high-throughput gás chromatographic-mass spectrometric assay for fluoxetine and norfluoxetine in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. **Journal of Chromatography B**, v. 716, p. 153-160, 1998.

BALDESSARINI, R. J. Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos da ansiedade. In: BRUTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: MGCraw Hill, 2007. Cap. 17. p. 383-410.

BAUMANN, P. Farmacokinetic-pharmacodynamic relationship of the selective serotonin reuptake inhibitors. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 31, n.6, p. 444 – 469, 1996.

BLIER, P.; SERRANO, A.; SCATTON, B. Differential responsiveness of the rat dorsal and median raphe 5-HT systems to 5-HT₁ receptor agonists and p-chloroamphetamine. **Sinapsy**, v.5, p. 120-133, 1990.

BRAGGIO, S. et al. A strategy for validation of bionalytical method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.14, p. 375-388, 1996.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Visalegis. Disponível em: <http://anvisa.gov.br> Acesso em: 02 Jan. 2009.

CANTWELL, F. F.; LOSIER, M. Liquid-liquid extraction. In: PAWLISZYN, J. **Sampling and sample preparation for field and laboratory**. Amsterdam: Elsevier, 2002. Cap. 11. p. 297-302.

CARLSSON, A; WONG, D. T. A note on the discovery of selective serotonin reuptake inhibitors. **Life Sciences**, v. 61, p. 1203, 1997.

CATTERSON, M. L.; PRESKORN, S. H. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors: clinical relevance. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 78, p. 203-208, 1996.

CHASIN, A. A. M. et al. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 11, n.1, p. 1-6, 1998.

DE OLIVEIRA, A. R. M. et al. Microextração em fase líquida (LPME): Fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 15, n. 3, p. 637-644, 2008.

DE SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. Enantioselective analysis of mirtazapine and its two major metabolites in human plasma by liquid chromatography–mass spectrometry after three-phase liquid-phase microextraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, p. 80-91, 2008.

DE SANTANA, F. J. M.; DE OLIVEIRA, A. R. M.; BONATO, P. S. Chiral liquid chromatographic determination of mirtazapine in human plasma using two-phase liquid-phase microextraction for sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 549, p. 96-103, 2005.

DICIONÁRIO de especialidades farmacêuticas. DEF 2007/08. 31 ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2007.

DE LUCIA, R. et al. **Farmacologia integrada**. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2007. Cap. 26, p. 226-232.

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

DJORDJEVIC, S. et al. Liquid chromatographic-mass spectrometric method for the determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma: application to clinical study. **II Farmaco**, v 60, p. 345-349, 2005.

EL-DAWY, M. A.; MABROUK, M. M.; ELBARBARY, F. A. Liquid chromatography determination of fluoxetine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 30, p. 561-571, 2002.

ERTÜRK, S. et al. A Sensitive HPLC method for the determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma with fluorescence detection. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 27, p. 38-43, 2005.

FARAHANI, H. et al. Development of liquid phase microextraction method based on solidification of floated organic drop for extraction and reconcentration of organochlorine pesticides in water sample. **Analytica Chimica Acta**, v. 626, p.166-173, 2008.

FERNANDES, C.; JIAYU, P.; SANDRA, P.; LANÇAS, F. M. Stir Bar Sorptive Extraction-LC-MS for the analysis of fluoxetine in plasma. **Chromatographia**, v. 64, p. 517-521, 2006.

FERNANDES, C. et al. Solid-phase microextraction–liquid chromatography (SPME–LC) determination of fluoxetine and norfluoxetine in plasma using a heated liquid flow through interface. **Journal of Chromatography B**, v. 847, p. 217-223, 2007.

FLANAGAN, R. J. et al. Micro-extraction techniques in analytical toxicology: short review. **Biomedical Chromatography**, v. 20, p. 530-538, 2006.

FONTANILLE, P. et al. Direct analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma by gas-chromatography with nitrogen-phosphorus detection. **Journal of Chromatography B**, v. 692, p. 337-343, 1997.

GATTI, G. et al. Improved enantioselective assay for the determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 784, p. 375-383, 2003.

GODNICK, P. J; Selective serotonin reuptake inhibitors in affective disorders-I: Basic pharmacology. **Journal of Psychopharmacology**, v. 12, p. 3-20, 1998.

GRAM, L.F. Drug therapy: fluoxetine. **The New England Journal of Medicine**, v. 17, p. 1354 -1361, 1994.

GUIA de medicamentos. Fundação Ezequiel Dias, 1 ed. Belo Horizonte, p. 429-434, 2007.

HALVORSEN, T. G.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Reduction of extraction times in liquid phase microextraction. **Journal of Chromatography B**, v. 760, p. 219-226, 2001.

HALVORSEN, T. G. et al. Liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry. Extraction from small volumes of biological samples. **Journal of Separation Sciences**, v. 26, p. 1520-1526, 2003.

HIEMKE, C. HÄRTTER, S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 85, p. 11-28, 2000.

HO, T. S.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction – comparison with conventional liquid-liquid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 963, p. 3-17, 2002.

HO, T. S. et al. Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport. **Journal of Chromatography A**, v. 998, p. 61-72, 2003.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Unicamp, 2006. Cap.IX. p. 273-397.

JEANNOT, M. A.; CANTWILLE, F. F. Solvent microextraction into a single drop. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 2236-2240, 1996.

JEPPESEN, U. et al. Dose-dependent inhibition of CYP1A2, CYP2C9 and CYP2D6 by citalopram, fluoxetine, fluvoxamine and paroxetine. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 51, p. 73-78, 1996.

JONSSON, O. **Membrane extraction in bioanalysis**. 2003. 70 f. Stockholm University, Sweden. 2003. Doctoral thesis.

JÖNSSON, J. A.; MATHIASSEN, L. Membrane-based techniques for sample enrichment. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p. 205-225, 2000.

JÖNSSON, J. A.; MATHIASSEN, L. Membrane extraction in analytical chemistry. **Journal of Separation Science**, v. 24, p. 495-507, 2001.

JÖNSSON, J. A.; MATHIASSEN, L. Membrane extraction for sample preparation. **LC-GC Europe**, London, oct. 2003.

JUAN, H.; ZHILING, Z.; HUANDE, L. Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/ESI). **Journal of Chromatography B**, v. 820, p. 33-39, 2005.

KATAOKA, H.; LORD, H. L. Sampling and sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. In: PAWLISZYN, J. (ed) **Sampling and sample preparation for field and laboratory**. Amsterdam: Elsevier. 2002. Cap. 23, p. 779-836.

KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 232-244, 2003.

KHALILI-ZANJANIA, M. R. et al. Extraction and determination of organophosphorus pesticides in water samples by a new liquid phase microextraction–gas chromatography–flame. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, p. 202–208, 2008.

LABAT, L. et al. Separation of new antidepressants and their metabolites by micellar electrokinetic capillary chromatography **Journal of Chromatography B**, v. 773, p. 17-23, 2002.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004.

LACASSIE, E. et al. 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. **Journal of Chromatography B**, v. 742, p. 229-238, 2000.

LEITE, F. **Validação em Análise Química**. 4. ed. Campinas: Átomo, 2002.

LEKE, R. et al. Antidepressivos tricíclicos: uma revisão sobre os aspectos farmacológicos e a importância do monitoramento terapêutico. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.17, n. 2, p. 51-59, 2004.

LLERENA, A. et al. Determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection in psychiatric patients. **Journal of Chromatography B**, v. 783, p. 25-31, 2003.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p. 17-63, 2000.

MAGALHÃES, I. R. S.; BONATO, P. S. Liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the enantioselective analysis of mefloquine in plasma samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 929-936, 2008.

MAIA, P. P.; RATH, S; REYES, F. G. R. Determination of oxytetracycline in tomatoes by HPLC using fluorescence detection. **Food Chemistry**, v.109, p. 212-218, 2008.

MALFARÁ, W. R. et al. Reliable HPLC method for therapeutic drug monitoring of frequently prescribed tricyclic and nontricyclic antidepressants. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 955-962, 2007.

MARTINDALE: The Complete Drug Reference. 33. ed. London: Pharmaceutical Press; 2002. p. 273-279.

MARTINS, I - Validação analítica. In: MORAES, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia analítica**. Rio de Janeiro. Guanabara Kogan, 2008. Cap. 3. p. 23.

MAYA, M. T. et al. Determination of the antidepressant fluoxetine in human plasma by LC with UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, p. 989-996, 2000.

MOLANDER, P. et al. Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine, paroxetine and their metabolites in plasma by temperature-programmed packed capillary liquid chromatography with on-column focusing of large injection volumes. **Journal of Chromatography B**, v. 766, p. 77-87, 2002.

MORENO, R. A.; MORENO, D. H.; SOARES M. B. M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.21, p. 24-40, 1999.

MÜLLER, S. et al. Semi-automated hollow-fibre membrane extraction, a novel enrichment technique for the determination of biologically active compounds in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 985, p. 99-106, 2003.

PAVLOVIC, D. M. et al. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26. p. 1062-1075, 2007.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 71, p. 2650-2656, 1999.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction and capillary electrophoresis of acid drugs. **Electrophoresis**, v. 21, p. 579-585, 2000.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. **Journal of Chromatography B**, v. 817, p.3-12, 2005.

PEDERSEN-BJEGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, p. 132 - 142, 2008.

PLOEMEN, J. P. H. T. M. et al. Use of physicochemical calculations of pKa and ClogP to predict phospholipidosis-inducing potential. A case study with structural related piperazines. **Experimental Toxicology and Pathology**, v. 55, p. 347-355, 2004.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Development in liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 565-574, 2003.

QUEIROZ, R. H. Extração líquido-líquido. In: MOREAU, R. L. E SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia analítica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.142-155.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p. 68-76, 2001.

RAGGI, M. A. et al. Determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma by high-pressure liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v 18, p. 193 -199, 1998.

RASMUSSEN, K. E. et al. Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for a drug analysis compatible with capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 873, p. 3-11, 2000.

RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 1-10, 2004.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROSSI, A; BARRACO, A; DONDA, P. Fluoxetine: A review on evidence based medicine. **Annals of General Hospital Psychiatry**, v.3, p. 1-8, 2004.

SANTOS, S. R. C. J. Monitorização terapêutica. In: MORAES, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia analítica**. Rio de Janeiro. Guanabara Kogan, 2008, Cap. 9. p. 94.

SANTOS-NETO et al. Fluoxetine and norfluoxetine analysis by direct injection of human plasma in a column switching liquid chromatographic system. **Journal of Separation Science**, v. 31, p. 78-85, 2008.

SCHILL, G. **Separation methods for drugs and related organic compounds**. Stockholm: Swedish Academy of Pharmaceutical Sciences, 1978. p.1.

SCIPPA, A. M. A. M.; OLIVEIRA, I. R. Antidepressivos. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 337-355.

SHAH, P. V. et al. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 81, n.3, p. 309-314, 1992.

SHEN, G.; LEE, H. K. Hollow fiber-protected liquid phase microextraction of triazine herbicides. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 648-654, 2002.

UGLAND, H. G.; KROAGH, M.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction as a sample preparation technique prior to capillary gas chromatographic-determination of benzodiazepines in biological matrices. **Journal of Chromatography B**, v. 749, p. 85-92, 2000.

UGLAND, H. G.; KROGH, M.; REUBSAET, L. Three-phase liquid-phase microextraction of weakly basic drugs from whole blood. **Journal of Chromatography B**, v. 98, p.127-135, 2003.

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. **Journal of Chromatography B**, v. 783, p. 481-490, 2003.

US FDA - United States Food and Drug Administration. Reviewer guidance Validation of chromatographic methods. Rockville: FDA Center for Drug Evaluation and Research (CDER), nov.1994.

USP - United States Pharmacopeia. National Formulary. 30. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007. p.1393-2783.

VAN DER MERBEL, N. C. Membrane-based sample preparation coupled on-line to chromatography or electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 856, p. 55-82, 1999.

VLASE, L.; IMRE, S.; LEUCUTA, S. Determination of fluoxetine and its *N*-desmethyl metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 66, p. 659-663, 2005.

WONG, D. T.; BYMASTER, F. P.; REID, L. R. Norfluoxetine enantiomers as inhibitors of serotonin uptake in rat brain. **Neuropsychopharmacology**, v. 8, p. 337-344, 1993.

WONG, D. T.; BYMASTER, F. P.; ENGLEMAN, E. A. Minireview: Prozac Fluoxetine, Lilly 110140), the first selective selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. **Life Sciences**, v. 57, p. 411-441, 1995.

WONG, D. T.; BYMASTER, F. P. Development of antidepressant drugs: fluoxetine (Prozac) and other selective serotonin uptake inhibitors. In: LILLY, T.; TANG, S. **Neurochemistry in Clinical Applications**. New York: Plenum Press, 1995. p. 84. Disponível em: < <http://cs.wisc.edu/~caitlin/papers/Prozac>>. Acesso em: 5 jan. 2009.

YANG, C. et al. Determination of tetandrine and fabgchinoline in plasma samples using hollow fiber liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1164, p. 56-64, 2007.

ZAINAHI, I. A.: **Monitorização terapêutica de antidepressivos em pacientes idosos**. 2001. 98 F. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de farmácia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

ZHANG, Z.; ZHANG, C.; SU, X.; MA, M.; CHEN, B.; YAO, S. Carried-mediated liquid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography for determination of illicit drugs in human urine. **Analytica Chimica Acta**, v. 621, p. 185-192, 2008.

ZHAO, L.; LEE, H. K. Application of static liquid-phase microextraction to the analysis of organochlorine pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, v. 919, p. 381-388, 2001.

APÊNDICE A – Instrumento para a coleta de dados.

PROTOCOLO DA PESQUISA

ficha nº.

1. Nome:
2. Telefone ou e-mail.....
3. Data/horário da coleta:.....
4. Sexo: F M
5. Idade:Peso:.....Altura:.....
6. Medicamento contendo fluoxetina:.....
7. Regime de dosagem da fluoxetina:.....
8. Tempo de uso do medicamento:.....
9. Finalidade do uso do medicamento:.....
10. Outros medicamentos usados (nome, dosagem, frequência, na última semana antes da coleta do sangue):
.....
.....
11. Ingestão de bebida alcoólica e frequência:
.....
.....
12. Uso de cigarro e quantidade por dia:
.....
.....
.....

APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
Laboratório de Análises Toxicológicas

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome :

.....
Documento de Identidade Nº :.....Sexo: ()M ()F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....

CEP:.....Telefone:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1.Título do Protocolo de Pesquisa: Microextração líquida-líquida (LPME) no preparo de amostra de plasma para análise cromatográfica em fase líquida de fluoxetina e norfluoxetina

2.Pesquisadora responsável: Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira

Cargo/Função: Professor titular/ aposentada

Inscrição Conselho Regional Farmácia, CRF-6 n. 2670

Pro-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa – serviço voluntário

3.Avaliação do risco da pesquisa:

Sem Risco ()

Risco Mínimo (x)

Risco Médio ()

Risco Baixo ()

Risco Maior ()

4.Duração da Pesquisa: 12 meses

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa; 2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos; incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; 3. Desconfortos e riscos esperados; 4. Benefícios que poderão ser obtidos; 5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

IV – ESCLARECIMENTOS DADO PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

3. Salvaguarda

**V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS
PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA:**

Pesquisadora responsável: Prof^a. Dr^a. Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira
Endereço: Universidade Federal de Alfenas
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 – Alfenas M.G
CEP: 37130-000. Fone: 3299-1342

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

Alfenas, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa
pesquisador

ou responsável legal

Assinatura do
(carimbo ou nome legível)

APÊNDICE C - Condições cromatográficas testadas usando o detector de fluorescência. (continua)

<i>COLUNA</i>	<i>FASE MÓVEL</i>	<i>λ Ex/ Em</i>
Select B 250 mm x 4 mm x 5 μm	AcN:tampão acetato de sódio 0,25 M pH 5,5 (45:55) a 1mL/min (25°C)	230 / 312 225 / 300 240 / 520 230 / 290
	MeOH:tampão acetato de sódio 0,25 M pH 5,5 (45:55) a 1mL/min (25°C)	235 / 280 230 / 290
	AcN:H2O pH5,5 (40:60) a 1mL/min (25°C)	230 / 290
	Tampão acetato de sódio 0,005 M, pH 4,0:MeOH:AcN (20:20:60) a 0,8mL/min (25°C)	
	Tampão acetato de sódio 0,005 M, pH 3,5:MeOH:AcN (10:65:25) a 1mL/min e a 0,8 mL/min (25°C)	
	Tampão acetato de sódio 0,005 M, pH 4,0:MeOH:AcN (20:60:20) a 1mL/min (25°C)	
	Tampão acetato de sódio 0,005 M, pH 4,0: AcN:MeOH (60:20:20) a 1mL/min (25°C)	
	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 3,5:MeOH:AcN (20:60:20) a 1mL/min (25°C)	
	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 4,5:MeOH:AcN (30:60:10) a 1mL/min (25°C) e a 1mL/min (30°C)	
	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 5,0:AcN (30:70), a 1ml/min (25° C), a 0,8 m/Lmin (25° C), a 1mL/min (30° C)	
	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 5,0:AcN (50:50) a 1mL/min (25°C)	
	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 4,5: AcN (35:65) a 1mL/ min (25°C)	230 / 290
	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 4,5: AcN (40:60) a 1mL/min (25°C)	
	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 4,5: AcN (35:65)a 1mL/min (25°C)	
C18 150 mm x 4,0 mm x 5 μm	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH4,5:MeOH (16:84) e a (26:74) a 1mL/min	
	AcN: tampão KH ₂ PO ₄ pH 3,0 (31:69) a 1mL/min (37°C)	
	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 4,0:MeOH:AcN (20:60:20) a 1mL/min (25°C)	
	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 4,5:AcN (45:55) a 0,8 mL/min (25°C)	

APÊNDICE C - Condições cromatográficas testadas usando o detector de fluorescência. (conclusão)

COLUNA	FASE MÓVEL	λ Ex/ Em
	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 4,5:AcN (50: 50) a 0,8 mL/min (25°C)	230 / 290
	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 4,5:AcN (55:45) a 0,8 mL/min (25°C)	
	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 4,5:AcN (60:40) a 0,8 mL/min (25°C)	
	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 5,0:AcN (50:50) a 0,8 mL/min (25°C)	
	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 4,0:AcN (50:50) a 0,8 mL/min (25°C)	
	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 3,0:AcN (50:50) a 0,8 mL/min (25°C)	
	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 2,:AcN (50:50) a 0,8 mL/min (25°C)	
	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 2,5:AcN (60:40) a 0,8 mL/min (25°C)	
	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 2,0:AcN (50:50) a 0,8 mL/min (25°C)	
	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 3,5: AcN (45:55) a 0,8 mL/min (25°C)	
	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 3,5:AcN (40:60) a 0,8 mL/min (25°C)	
	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 2,5: AcN (55:45) a 0,8 mL/min (25°C)	
	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 2,5: AcN (60:40) a 0,8 mL/min (25°C)	
	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 2,25:AcN (60:40) a 0,8 mL/min (25°C)	
	Tampão acetato de amônio 0,005 M pH 5,0:AcN (55:45) a 0,8 mL/min (25°C)	
C18 250 mm x 4,4 mm x 5 μ m	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 4,5:AcN (40:60) a 1,0 mL/min (25°C)	
	Tampão acetato de sódio 0,005 M pH 4,5:AcN (60:40) a 1,0 mL/min (25°C)	
Select B 125 mm x 4 mm x 5 μ m	Tampão acetato de sódio 0.005 M pH 4,5:AcN (40:60) a 0,6 mL/min (25°C)	
	Tampão acetato de sódio 0.005 M pH 4,5:AcN (50:50) a 0,6 mL/min (25°C)	

AcN = acetonitrila

Em = λ de emissão

Ex = λ de excitação