



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LETÍCIA APARECIDA MARQUES

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE
MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE FLUOXETINA EM PLASMA
COM MICROBARRA DE AGITAÇÃO POR HPLC-FD**

LETÍCIA APARECIDA MARQUES

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE
MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE FLUOXETINA EM PLASMA
COM MICROBARRA DE AGITAÇÃO POR HPLC-FD**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf.

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Marques, Leticia Aparecida.

DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE FLUOXETINA EM PLASMA COM MICROBARRA DE AGITAÇÃO POR HPLC-FD / Leticia Aparecida Marques. - Londrina, 2018.
55 f. : il.

Orientador: Suzana Lucy Nixdorf.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.
Inclui bibliografia.

1. Depressão - Teses. 2. Planejamento experimental - Teses. 3. Extração sortiva em barra de agitação - Teses. 4. Cromatografia líquida com detecção por fluorescência - Teses. I. Nixdorf, Suzana Lucy. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

LETÍCIA APARECIDA MARQUES

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
PARA EXTRAÇÃO DE FLUOXETINA EM PLASMA COM
MICROBARRA DE AGITAÇÃO POR HPLC-FD**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Maria Luiza Zeraik
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 20 de Janeiro de 2016.

*Dedico este trabalho à minha família e aos
participantes voluntários desta pesquisa.*

*“Não posso
Não é possível
Digam-lhe que é totalmente impossível
Agora não pode ser
É impossível
Não posso.*

Digam-lhe que estou tristíssimo, mas não posso ir esta noite ao seu encontro.

*Contem-lhe que há milhões de corpos a enterrar
Muitas cidades a reerguer, muita pobreza pelo mundo.
Contem-lhe que há uma criança chorando em alguma parte do mundo
E as mulheres estão ficando loucas, e há legiões delas carpindo
A saudade de seus homens; contem-lhe que há um vácuo
Nos olhos dos párias, e sua magreza é extrema; contem-lhe*

*Que a vergonha, a desonra, o suicídio rondam os lares, e é preciso reconquistar a vida
Façam-lhe ver que é preciso eu estar alerta, voltado para todos os caminhos
Pronto a socorrer, a amar, a mentir, a morrer se for preciso.
Ponderem-lhe, com cuidado – não a magoem... – que se não vou
Não é porque não queira: ela sabe; é porque há um herói num cárcere
Há um lavrador que foi agredido, há uma poça de sangue numa praça.
Contem-lhe, bem em segredo, que eu devo estar prestes, que meus
Ombros não se devem curvar, que meus olhos não se devem*

*Deixar intimidar, que eu levo nas costas a desgraça dos homens
E não é o momento de parar agora; digam-lhe, no entanto
Que sofro muito, mas não posso mostrar meu sofrimento
Aos homens perplexos; digam-lhe que me foi dada
A terrível participação, e que possivelmente
Deverei enganar, fingir, falar com palavras alheias
Porque sei que há, longínqua, a claridade de uma aurora.
Se ela não compreender, oh procurem convencê-la
Desse invencível dever que é o meu; mas digam-lhe
Que, no fundo, tudo o que estou dando é dela, e que me
Dói ter de despojá-la assim, neste poema; que por outro lado
Não devo usá-la em seu mistério: a hora é de esclarecimento
Nem debruçar-me sobre mim quando a meu lado
Há fome e mentira; e um pranto de criança sozinha numa estrada
Junto a um cadáver de mãe: digam-lhe que há
Um naufrago no meio do oceano, um tirano no poder, um homem
Arrepentido; digam-lhe que há uma casa vazia
Com um relógio batendo horas; digam-lhe que há um grande
Aumento de abismos na terra, há súplicas, há vociferações
Há fantasmas que me visitam de noite
E que me cumpre receber, contem a ela da minha certeza no amanhã
Que sinto um sorriso no rosto invisível da noite
Vivo em tensão ante a expectativa do milagre; por isso
Peçam-lhe que tenha paciência, que não me chame agora
Com a sua voz de sombra; que não me faça sentir covarde
De ter de abandoná-la neste instante, em sua imensurável
Solidão, peçam-lhe, oh peçam-lhe que se cale
Por um momento, que não me chame
Porque não posso ir
Não posso ir
Não posso.”*

*Trecho de “Mensagem à poesia”
Vinícius de Moraes, “Antologia Poética”, 2 ed.
Editora do Autor - Rio de Janeiro, 1960. p. 160.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf pela constante orientação durante este trabalho, pela sua amizade e confiança.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa e Profa. Dra. Maria Luiza Zeraik, pelo aceite do convite.

Aos participantes voluntários da pesquisa, sem os quais este trabalho não seria executado.

Aos Dr. Heber Odebrecht Vargas, Dr. Marcos Liboni e Dr. Luiz Gustavo Piccoli de Melo pelo auxílio com a amostragem dos pacientes.

Ao Programa de Mestrado em Química da UEL pela oportunidade de formação e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Aos membros do Laboratório de Desenvolvimento, Instrumentação e Automação Analítica (Lab DIA) – muito obrigada por toda ajuda, convivência e carinho! Vocês são especiais.

À minha família – meu pai, Sérgio; minha mãe, Maria Antonia; meu irmão, Lucas; e aos amigos que, de longe ou de perto, estiveram me apoiando sempre!

À Deus, pelo dom da minha vida e por cada novo amanhecer que tenho a oportunidade de presenciar.

MARQUES, Letícia Aparecida. **Desenvolvimento, otimização e validação de método para extração de fluoxetina em plasma com microbarra de agitação por HPLC-FD**. 2016. 55 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

A depressão afeta cerca de 350 milhões de pessoas ao redor do mundo, o que corresponde a 4,8% da população atual. A fluoxetina é um dos antidepressivos mais amplamente administrados nos tratamentos clínico e medicamentoso da depressão, sendo assim, seu monitoramento terapêutico é de interesse da comunidade científica e dos pacientes. Embora seja essencial, a determinação destes em matrizes biológicas complexas constitui um desafio analítico por requerer etapas de limpeza (*clean-up*) e pré-concentração do analito e seus metabólitos na amostra. Este trabalho teve como objetivo desenvolver, otimizar e validar um método de extração de fluoxetina em plasma utilizando microbarra de agitação (mSBSE), seguida da análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detecção por fluorescência (CLAE-DF, do inglês HPLC-FD). A otimização das condições experimentais empregou planejamento experimental para as variáveis temperatura e tempo na etapa de sorção; e estudos univariados para a velocidade de agitação na etapa de sorção, estudo cinético e do modo de dessorção líquida para a etapa de dessorção. Como condições ótimas, obteve-se: etapa de sorção efetuada a 50°C, durante 40 min, sob velocidade de agitação média (840 rpm); etapa de dessorção realizada por agitação magnética por 40 min. O método mSBSE-HPLC-FD para fluoxetina foi validado de acordo com a RDC nº 899/2003 da ANVISA, contemplando a faixa dinâmica linear ($r > 0,99$) de trabalho de 25,0 a 250,0 ng mL⁻¹, com limites de detecção e quantificação para a curva em matriz de 9,80 e 32,67 ng mL⁻¹ respectivamente. O método proposto para determinação de fluoxetina em plasma foi preciso e exato, considerando a repetitividade intra-dia e inter-dias de, respectivamente, 4,81% e 9,53% e taxa de recuperação de 101,05%. Verificou-se maior sensibilidade, linearidade, melhor *clean-up*, além de menor dispersão dos dados para o método mSBSE desenvolvido, quando comparado ao método referência, empregando extração líquido-líquido (LLE). O método desenvolvido poderá ser utilizado na determinação da concentração plasmática de fluoxetina de pacientes em terapia e de um grupo em ausência do uso do fármaco (grupo controle), visando posteriormente diferenciar os grupos estatisticamente por análise hierárquica, considerando a diferença dos níveis plasmáticos do medicamento.

Palavras-chave: Antidepressivo. Extração. Cromatografia líquida. Detecção por fluorescência. Planejamento experimental.

MARQUES, Leticia Aparecida. **Development, optimization and validation method using micro stir bar extraction for fluoxetine in plasma determination by HPLC-FD.** 2016. 55 p. Dissertation (Chemistry Master Degree) – Londrina State University, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Depression affects about 350 million of people around the world, corresponding to 4.8% of current population. Fluoxetine is one of the most widely administered antidepressants for clinical and pharmacological treatment of depression. So therapeutic monitoring is of scientific community's and patient's interest. Although this is essential, determining in complex biological matrices remains as an analytical challenge, because it's requires pre-concentration and clean-up steps of the analyte and its metabolites in the sample. This study aimed to develop, optimize and validate a method for fluoxetine extraction from plasma using micro stir bar extraction (mSBSE), followed by analysis by high-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection (HPLC-FD). The optimization of experimental conditions employed experimental design for the variables temperature and time of sorption step; and univariate studies for stirring speed in the sorption step, mode and kinetic study of the desorption step. These were the optimal conditions for mSBSE process obtained: sorption step performed at 50°C for 40 min under medium agitation (840 rpm); and desorption step performed by magnetic stirring for 40 min. The mSBSE-HPLC-FD method was validated following the ANVISA RDC n° 899/2003, contemplating the linear dynamic range ($r > 0,99$) from 25.0 to 250.0 ng mL⁻¹ and obtaining LOQ and LOD of 32.67 and 9.80 ng mL⁻¹ respectively in plasmatic matrix curve. The proposed method proved to be precise and accurated, considering the intra-day repeatability of 4.81% and inter-day of 9.53% respectively, and recovery rate of 101.05%. The validated method showed a higher sensitivity, linearity, better clean-up and less dispersion of data when compared to the liquid-liquid extraction method (LLE) used as reference. The developed method can be used for fluoxetine patients plasma concentration determining on therapy and without use (control group). It is expected to differentiate these groups statistically through hierarchical analysis, by to difference in plasma.

Key words: Antidepressant. Extraction. Liquid Chromatography. Fluorescence detection. Experimental design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estruturas moleculares dos ISRSs: (a) fluoxetina; (b) sertralina; (c) escitalopram; (d) fluvoxamina; (e) paroxetina; (f) citalopram.....	18
Figura 2-	Esquema de ação farmacocinética dos ISRS.	19
Figura 3-	Metabolização da molécula de fluoxetina (à esquerda) ao seu respectivo metabólito demetilado, norfluoxetina (à direita).....	20
Figura 4 -	Módulos básicos de um sistema de cromatografia líquida.	25
Figura 5 -	Micro barra (mSBSE) desenvolvida.	29
Figura 6 -	Cromatogramas das análises de FLU ($t_R = 7,4$ min): (a) Padrão 250,00 ng mL ⁻¹ dissolvido na fase móvel; (b) amostra isenta de matriz adicionada de padrão 250 ng mL ⁻¹ extraída por mSBSE; (c) amostra em matriz de plasma adicionada de padrão 250 ng mL ⁻¹ extraída por mSBSE e (d) amostra em matriz de plasma adicionada de padrão 250 ng mL ⁻¹ extraída por LLE	34
Figura 7 -	Diagrama de Pareto para as variáveis x_1 e x_2 do planejamento composto central	36
Figura 8 -	(a) Superfície de resposta para extração - etapa de sorção de FLU (ng mL ⁻¹) em plasma humano, em função das variáveis independentes temperatura (°C) e tempo (min); (b) região de maior extração - etapa de sorção de FLU (ng mL ⁻¹) em vermelho e pontos experimentais indicados em branco.....	37
Figura 9 -	Parâmetro de desejabilidade estimado na condição ótima de temperatura e tempo de extração - etapa de sorção de FLU em plasma humano.....	38
Figura 10 -	Estudo dos níveis de velocidade de agitação para extração por mSBSE na etapa de sorção de FLU de plasma humano ($n=5$) a partir da concentração plasmática de 250,00 ng mL ⁻¹	39
Figura 11 -	Curva de cinética na etapa de dessorção da extração de FLU de plasma humano empregando mSBSE ($n=5$) a partir da concentração plasmática de 250,00 ng mL ⁻¹ , utilizando-se agitação magnética média e temperatura de 50°C	40

Figura 12 - Estudo do modo de dessorção (agitação magnética média ou ultrassom, a 37 kHz) utilizando mSBSE para extração de FLU em plasma humano ($n=5$) a partir da concentração plasmática de 250,00 ng mL ⁻¹ , à temperatura de 50°C.	41
Figura 13 - Curvas analíticas para o método mSBSE-HPLC-FD para FLU: (a) em matriz de <i>pool</i> de plasma (curva com pontos em vermelho; $n=9$) e (b) sem matriz (curva com pontos em preto; $n=9$).....	42
Figura 14 - Curva analítica para o método LLE-HPLC-FD para FLU em plasma humano ($n=9$)	43
Figura A1 -Resultados experimentais em função dos resultados preditos pelo modelo polinomial para a otimização da sorção por mSBSE de FLU em plasma humano.....	52
Figura A2 -Resíduos dos resultados experimentais obtidos no delineamento composto central da etapa de sorção empregando mSBSE de FLU em plasma humano.....	53
Figura A3 -Resíduos dos dados utilizados para construção da curva analítica em matriz empregando mSBSE de FLU em plasma humano	54
Figura A4 -Resíduos dos dados utilizados para construção da curva analítica em ausência de matriz empregando mSBSE de FLU em plasma humano.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Delineamento dos experimentos do planejamento fatorial 2^2 para as variáveis temperatura e tempo na etapa de sorção da extração por mSBSE de fluoxetina em plasma	30
Tabela 2 - Variáveis independentes e níveis de variação do planejamento composto central na etapa de sorção da extração empregando mSBSE de fluoxetina em plasma humano	31
Tabela 3 - ANOVA para as variáveis independentes da etapa da sorção mSBSE de FLU em plasma humano.....	35
Tabela 4 - Parâmetros de validação para o método mSBSE-HPLC-FD para FLU em plasma humano ($n=9$)	43
Tabela A1 - Delineamento composto central com duas variáveis codificadas (x_1 e x_2) e respectiva função resposta (Y) na etapa de sorção da extração empregando mSBSE de FLU 250 ng mL^{-1} em plasma humano.....	52
Tabela A2 - Concentração de FLU (ng mL^{-1}) mensurada em função dos diferentes níveis de velocidade de agitação magnética empregados na etapa sorção de extração a partir da concentração plasmática de 250 ng mL^{-1}	53
Tabela A3 - Concentração de FLU (ng mL^{-1}) em função do tempo de dessorção na etapa da extração a partir da concentração plasmática de 250 ng mL^{-1}	53
Tabela A4 - Concentração de FLU (ng mL^{-1}) em função dos modos de dessorção da extração a partir da concentração plasmática de 250 ng mL^{-1}	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADS	Alquidiolsílica
ADTs	Antidepressivos tricíclicos
AEHU	Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CMD	Concentração média determinada
CME	Concentração média experimental
CT	Concentração teórica
CV	Coefficiente de variação
DP	Desvio padrão
DPa	Desvio padrão do intercepto
FD	Detector de fluorescência
FLU	Cloridrato de fluoxetina
GC	Cromatografia gasosa (<i>Gas Chromatography</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IC	Inclinação da curva
IMAOs	Inibidores da monoaminoxidase
ISRSs	Inibidores seletivos da receptação da serotonina
LC	Cromatografia líquida (<i>Liquid Chromatography</i>)
LD	Dessorção líquida (<i>Liquid desorption</i>)
LLE	Extração líquido líquido (<i>Liquid Liquid Extraction</i>)
LOD	Limite de detecção (<i>Limit of detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (<i>Limit of quantification</i>)
MIPs	Polímeros molecularmente impressos
MS	Espectrometria de massas (<i>Mass Spectrometry</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDA	Detector de arranjo de fotodiodos (<i>Photodiode Array</i>)
PDMS	Polidimetilsiloxano
PEEK	Poliéter-éter-cetona
r	Coefficiente de correlação linear
r^2	Coefficiente de determinação

r^2_{aj}	Ajuste do modelo
RAM	Material de acesso restrito
RI	Índice de refração
SBSE	Extração sortiva em barra de agitação (<i>Stir Bar Sorptive Extraction</i>)
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SPME	Micro extração em fase sólida (<i>Solid Phase Micro Extraction</i>)
TD	Dessorção térmica (<i>Thermal desorption</i>)
t_R	Tempo de retenção
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra-alta resolução (<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	A DEPRESSÃO E OS ANTIDEPRESSIVOS	16
1.2	A FLUOXETINA	19
1.3	AS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO – A SBSE COMO FERRAMENTA ANALÍTICA	21
1.4	A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	23
1.5	OBJETIVO	27
2	PARTE EXPERIMENTAL	28
2.1	REAGENTES E SOLUÇÕES	28
2.2	AMOSTRAS DE PLASMA	28
2.2.1	Coleta das Amostras	28
2.2.2	Processamento das Amostras de Plasma.....	29
2.3	OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO SBSE – SORÇÃO E DESSORÇÃO.....	29
2.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO MSBSE-HPLC-FD PARA FLU EM PLASMA	31
2.5	COMPARAÇÃO COM MÉTODO LLE-HPLC-FD PARA FLU EM PLASMA	33
2.6	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	33
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47
	APÊNDICES	51
	APÊNDICE A – Informação Suplementar	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 A DEPRESSÃO E OS ANTIDEPRESSIVOS

A depressão é uma síndrome psiquiátrica complexa, de ocorrência frequente dentre as principais doenças psiquiátricas e que prejudica a capacidade do indivíduo de se relacionar com a sociedade e o ambiente. Variações de humor, tristeza, sentimento de culpa, ansiedade, insônia, perda de apetite e interesse sexual são alguns dos sintomas comuns desta doença (TENG, HUMES, DEMETRIO, 2005; OMS, 2015).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que a depressão afeta mundialmente cerca de 350 milhões de pessoas ao redor do mundo, o que corresponde a aproximadamente 4,8% da população atual. As estimativas apontam que 10% das gestantes apresentam quadro de depressão pós-parto, limitando a capacidade de cuidarem de seus bebês e podendo afetar seriamente o desenvolvimento da criança. Já em pacientes idosos, a depressão geralmente encontra-se associada a doenças clínicas crônicas, agravando o quadro do paciente e desta forma, relaciona-se à maiores índices de mortalidade (OMS, 2015).

Há pelo menos 30 anos, as origens biológicas dos transtornos depressivos têm sido explicadas pela hipótese monoaminérgica da depressão. Esta teoria supõe que a depressão seja decorrente da menor biodisponibilidade de neurotransmissores na fenda sináptica, principalmente a serotonina, noradrenalina e dopamina. O conhecimento da farmacocinética dos fármacos antidepressivos no sistema nervoso central reforça esta hipótese, uma vez que estes medicamentos promovem o aumento da biodisponibilidade dos neurotransmissores, seja por inibição de suas recaptações ou pela inibição da enzima responsável por sua degradação (VISMARI, PALERMO-NETO, ALVES, 2008; PIVETTA, 2014).

Mais recentemente, as pesquisas têm mostrado que indivíduos estressados, física ou mentalmente, podem perder a capacidade de regular de modo apropriado os processos inflamatórios. Os estudos apontam que, em pacientes depressivos, existe considerável aumento do número de leucócitos sanguíneos periféricos e da razão CD_4^+/CD_8^+ ; elevação da concentração plasmática de proteínas de fase aguda, bem como maiores níveis sanguíneos de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IL-23. Também foram verificadas alterações na expressão de antígenos,

diminuição do número de linfócitos e na atividade de células NK e ainda, redução na resposta celular a mitógenos. Este distúrbio na ativação das respostas imunoinflamatórias Th1/Th2 é associado à ocorrência ou manutenção da fisiopatologia da depressão (VISMARI, PALERMO-NETO, ALVES, 2008; PIVETTA, 2014).

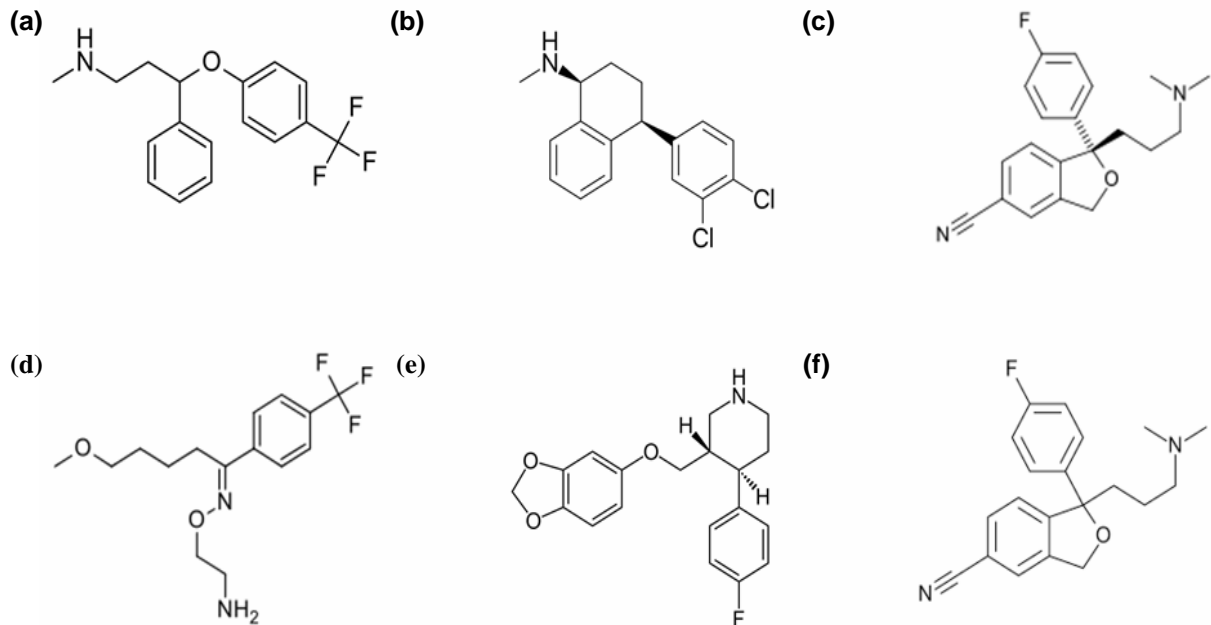
Embora alguns aspectos genéticos e neurológicos da doença sejam bem conhecidos, estes não consideram as questões sociais que estão por trás das alarmantes estatísticas da depressão pois, embora o desenvolvimento científico apresente hipóteses para explicar a ocorrência e o tratamento desta fisiopatologia, a depressão ainda é tratada com preconceito e até mesmo descaso (BARRETO, VASCONCELOS, ALBUQUERQUE, 2014; OMS, 2015).

Existem basicamente dois tipos de tratamento para os transtornos depressivos: a psicoterapia e o tratamento medicamentoso. A psicoterapia é geralmente associada ao tratamento farmacológico e possibilita a compreensão dos aspectos sociais da doença, promovendo melhoras sobre o humor, ânimo e vontade de viver. O tratamento medicamentoso da depressão tornou-se possível a partir do final da década de 1950, quando verificou-se que alguns fármacos recém-descobertos proporcionavam efeito clínico no tratamento de distúrbios psiquiátricos (MORENO, MORENO, SOARES, 1999; GORENSTEIN, SCAVONE, 1999; TENG, HUMES, DEMETRIO, 2005).

Inicialmente, duas classes de fármacos antidepressivos eram comercializadas - os antidepressivos tricíclicos (ADTs) e os inibidores da monoaminoxidase (IMAOs). Entretanto, estes fármacos promoviam diversos efeitos colaterais indesejáveis devido a inespecificidade de sua ação farmacológica e/ou à decorrência de altas dosagens administradas. Assim, esses predominaram no mercado até os anos 80 quando uma nova classe de antidepressivos surgiu (MORENO, MORENO, SOARES, 1999; GORENSTEIN, SCAVONE, 1999; MELO et al., 2009). Esta nova geração de antidepressivos mostrou-se capaz de agir de maneira mais seletiva nos ciclos metabólicos da noradrenalina e/ou serotonina e, de mesma eficácia dos clássicos ADTs, surgiu depois de anos de pesquisa. Estes novos fármacos, denominados inibidores seletivos da recaptção da serotonina (ISRSs), incluem os fármacos fluoxetina, sertralina, fluvoxamina, paroxetina e citalopram, cujas estruturas moleculares são apresentadas na Figura 1 (RAGGI et al., 1998; KRISTOFFERSEN et al., 1999; MORENO, MORENO, SOARES, 1999;

MOLANDER et al., 2001; PRADO et al. 2006; CHAVES et al., 2010).

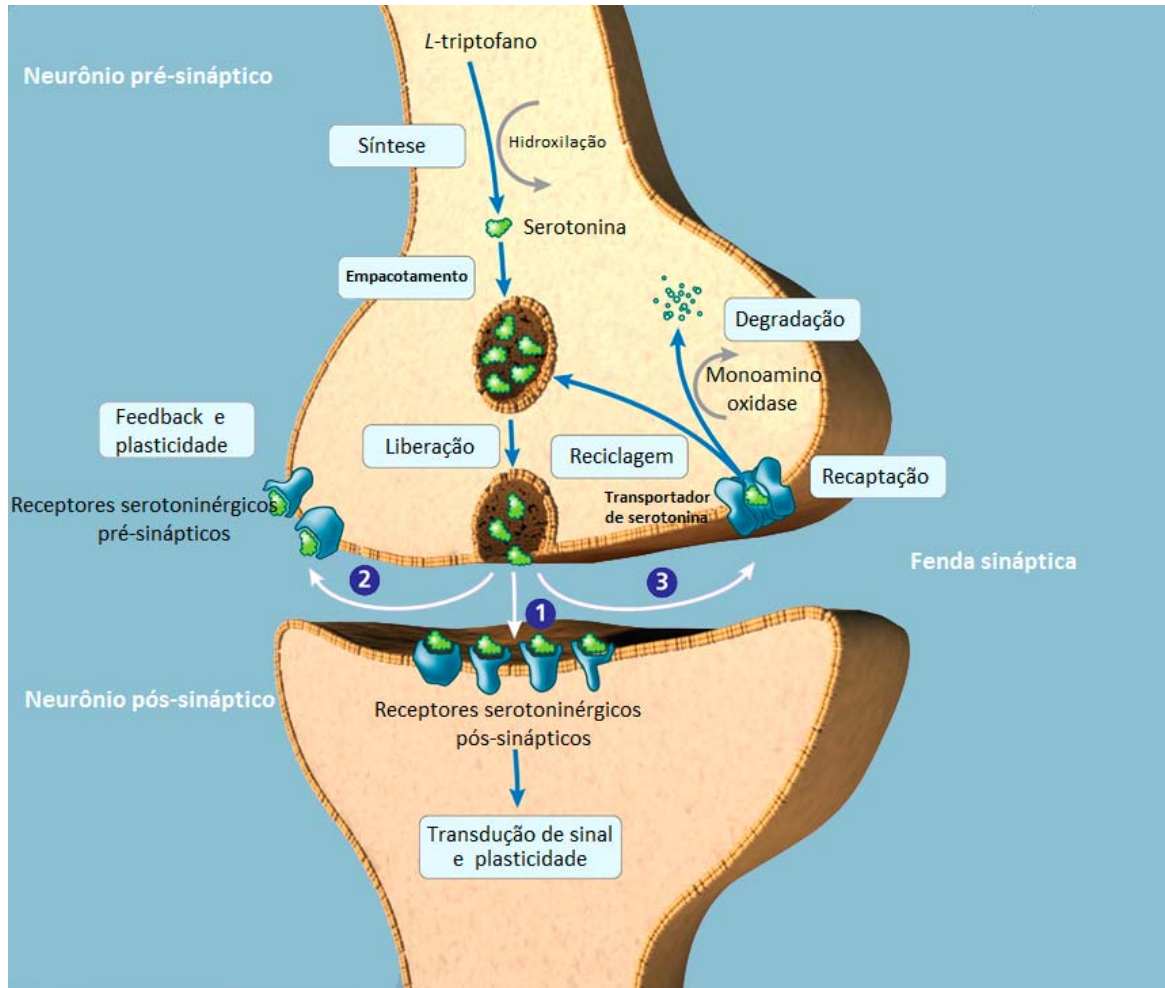
Figura 1 - Estruturas moleculares dos ISRSs: (a) fluoxetina; (b) sertralina; (c) escitalopram; (d) fluvoxamina; (e) paroxetina; (f) citalopram.



Fonte: Domínio público (Google).

A farmacocinética de ação dos ISRSs consiste na inibição seletiva da recaptação da serotonina. Inicialmente, ocorrem diversas reações de hidroxilação e descarboxilação do anel aromático do precursor *L*-triptofano, um aminoácido essencial, originando moléculas de serotonina (Figura 2). Estas moléculas são reunidas em uma vesícula que será liberada na fenda sináptica, região entre o axônio do neurônio pré-sináptico e o dendrito do neurônio pós-sináptico. Quando liberada na fenda sináptica, a serotonina pode seguir três vias principais: (1) ligar-se aos receptores pós-sinápticos e (2) pré-sinápticos; (3) ser recaptada pelo transportador de serotonina 5-HT. Os efeitos terapêuticos e adversos dos ISRS resulta principalmente nas vias 2 e 3, potencializando a neurotransmissão serotoninérgica devido ao prolongamento do tempo de permanência do neurotransmissor e à elevação da concentração da serotonina na fenda sináptica (RAGGI et al., 1998; MORENO, MORENO, SOARES, 1999; KRISTOFFERSEN et al., 1999; MOLANDER et al., 2001; PRADO et al., 2006; CHAVES et al., 2010; FEIJÓ; BERTOLUCI; REIS, 2010).

Figura 2 - Esquema de ação farmacocinética dos ISRS.



Fonte: Adaptado de ROT, MATHEW, CHARNEY (2009).

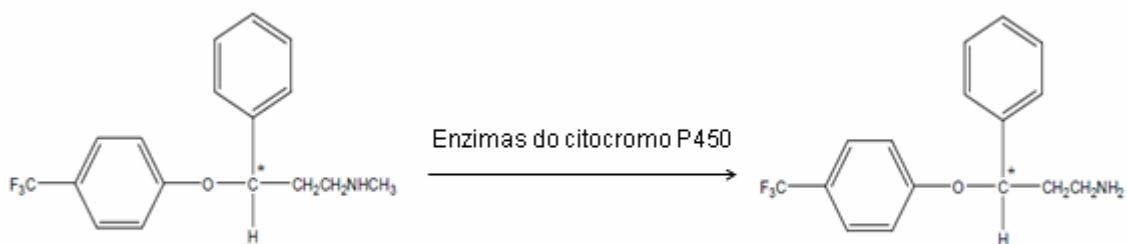
1.2 A FLUOXETINA

A fluoxetina (*N*-metil- γ -[4-(trifluorometil)fenoxi]benzeno-propanamina) (Figura 1a), um composto bicíclico derivado de fenilpropilamina, é o ISRS mais empregado para o tratamento da depressão severa, ansiedade, fobia social, bulimia nervosa, transtorno obsessivo-compulsivo, síndrome do pânico, distímia e tem sido indicada para doença disfórica pré-menstrual e anorexia nervosa (RAGGI et al., 1998; KRISTOFFERSEN et al., 1999; MOLANDER et al., 2001; PRADO et al., 2006; FERNANDES et al., 2006; CHAVES et al. 2007; UNCETA et al., 2007; SILVA, LANÇAS, QUEIROZ, 2009).

O seu produto metabólito farmacologicamente ativo, a norfluoxetina (Figura 3), proveniente da *N*-demetilação biológica da fluoxetina, possui ação prolongada com atividade clínica de inibição da recaptção da serotonina

(transportador 5-HT) e inibição de isoenzimas do citocromo P450 no fígado. A metabolização do fármaco ocorre extensivamente no fígado, sendo eliminado pela urina, e o efeito terapêutico pode ser constatado de 2 a 3 semanas após o início do tratamento (KRISTOFFERSEN et al., 1999; SABBIONI et al., 2004; UNCETA et al., 2007; SILVA, LANÇAS, QUEIROZ, 2009).

Figura 3 - Metabolização da molécula de fluoxetina (à esquerda) ao seu respectivo metabólito demetilado, norfluoxetina (à direita).



*Carbono anomérico

Fonte: Adaptado de Unceta (2007).

O fármaco é comercializado na forma de cloridrato de fluoxetina (FLU) e consiste em uma mistura racêmica dos dois enantiômeros (*S*- e *R*-fluoxetina), equipotentes no processo de bloqueio da recaptação do transportador 5-HT, que ocorre em poucas horas. O substituinte *p*-trifluorometil na molécula de FLU confere ao fármaco alta seletividade e potencialidade para a inibição da recaptação da serotonina, como resultado de efeitos de repulsão eletrônica ou lipofilicidade (PRADO et al., 2006).

A FLU tem se mostrado tão eficiente quanto os antidepressivos tricíclicos tradicionais (ADTs) e mais potente que esses, o que comparativamente minimiza seus efeitos adversos (MORENO, MORENO, SOARES, 1999; PRADO et al., 2006). A dosagem diária sugerida é de 20 mg dia⁻¹, podendo variar até 80 mg dia⁻¹, de acordo com o efeito clínico desejado e/ou diferença na procedência do medicamento (referência ou genérico). De qualquer forma, as doses administradas são relativamente menores se comparada àquelas utilizadas para ADTs, que chegam a 150 mg dia⁻¹ (RAGGI et al., 1998; FERNANDES et al., 2006; SILVA, LANÇAS, QUEIROZ, 2009). As concentrações plasmáticas máximas ocorrem no

período de 6 a 8 h após a ingestão da droga, variando de 90-300 ng mL⁻¹. A meia vida da FLU é de 1 a 4 dias e é o ISRS mais lentamente eliminado do organismo (MORENO, MORENO, SOARES, 1999; KRISTOFFERSEN et al., 1999; SABBIONI et al., 2004; FERNANDES et al., 2006; UNCETA et al., 2007; SILVA, LANÇAS, QUEIROZ, 2009).

1.3 AS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO – A SBSE COMO FERRAMENTA ANALÍTICA

A determinação de FLU em fluídos biológicos é importante para a realização de estudos farmacocinéticos, de monitoramento terapêutico e de bioequivalência do fármaco no organismo humano (MOLANDER et al., 2001; FERNANDES et al., 2006).

O plasma é um fluido biológico constituído de água, diversos eletrólitos e cerca de 7 a 8% de proteínas. Devido a complexidade dessa matriz biológica, a quantificação de quaisquer analitos em plasma sofre interferência destes outros componentes, dificultando a análise de interesse. Baseadas no princípio de equilíbrio de extração, as técnicas de extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*), micro extração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Micro Extraction*) e, mais recentemente, extração sortiva em barra de agitação (SBSE, do inglês *Stir Bar Sorptive Extraction*) são amplamente utilizadas para *clean-up* e pré-concentração dos analitos de matrizes complexas.

A SBSE consiste em uma microtécnica de preparo de amostra que permite a pré-concentração de analitos em barra de agitação magnética recoberta por uma fase polimérica extratora. O mecanismo de retenção dos analitos baseia-se na partição destes à fase polimérica e, por se tratar de uma técnica de equilíbrio, o processo SBSE precisa ser estudado para máxima extração do analito para o determinado recobrimento polimérico. Em relação a SPME, a extração sortiva apresenta vantagens como o uso de um menor volume de solventes e de amostra, a possibilidade de automação, a facilidade de aplicação, bem como maiores eficiências de extração (BALTUSSEN et al., 1999; VALENTE, AUGUSTO, 2000; FERNANDES et al., 2006; DAVID, SANDRA, 2007; MELO et al., 2009; NOGUEIRA, 2012).

O processo SBSE consiste em duas etapas principais: a extração (sorção) e dessorção da fase sortiva, seguida de separação e quantificação por

cromatografia líquida (LC, *Liquid Chromatography*) ou gasosa (GC, *Gas Chromatography*). A etapa de extração é efetuada por agitação magnética da barra sortiva durante tempo necessário para estabelecimento do equilíbrio de partição, período que geralmente varia entre 30 e 240 min. Amostras líquidas podem ser extraídas em frascos (*vial*, do inglês) por *headspace* ou por imersão da barra (BALTUSSEN et al., 1999; DAVID, SANDRA, 2007; NOGUEIRA, 2012). O tempo de equilíbrio da etapa de extração, a velocidade de agitação, o pH e a força iônica da matriz, o volume de amostra e a temperatura são estudados, pois afetam de modo significativo as concentrações de analito. A etapa de dessorção pode ser realizada de dois modos: dessorção térmica (TD – *thermal desorption*), seguida de detecção por cromatografia gasosa, ou a dessorção líquida (LD – *liquid desorption*), com análise por cromatografia líquida ou gasosa (BALTUSSEN et al., 1999; DAVID, SANDRA, 2007). A TD é indicada para dessorção de compostos voláteis e semivoláteis no injetor de um cromatógrafo gasoso, obtendo-se alta sensibilidade analítica, uma vez que toda amostra é injetada, sendo utilizadas temperaturas entre 150 e 300 °C. A TD usualmente se processa por períodos de 10 min e vazões que variam entre 10 a 100 mL min⁻¹. A LD é recomendada para analitos semivoláteis e termolábeis e alguns fatores, como o tipo de solvente, o tempo de imersão, número de etapas, composição do meio de dessorção e o modo de dessorção (agitação mecânica ou ultrassom) influenciam nesta etapa e também podem ser otimizados para melhoria da eficiência do processo SBSE como um todo (BALTUSSEN et al., 1999; FERNANDES et al., 2006; DAVID, SANDRA, 2007; MELO et al., 2009).

As barras SBSE são feitas de haste magnética ou metálica encapsulada de vidro recoberto por uma fase polimérica. Na maioria das aplicações, utiliza-se o polímero polidimetilsiloxano (PDMS) como recobrimento polimérico das barras sortivas uma vez que este, devido ao seu amplo uso na SPME, tem propriedades de difusão bem definidas; apresenta boa estabilidade térmica e mecânica; possui inércia química e promove rápida dessorção térmica; além do mecanismo de retenção dos analitos ser baseado na sua capacidade de estabelecer interações hidrofóbicas, do tipo van der Waals e ligações de hidrogênio (BALTUSSEN et al., 1999; DAVID, SANDRA, 2007; MELO et al., 2009; NOGUEIRA, 2012).

As barras sortivas comercialmente disponíveis são conhecidas como *Twister*[®] e recobertas de PDMS puro. Entretanto, devido à seletividade do PDMS, a

técnica fica restrita a extração de compostos apolares. O desenvolvimento de novas fases poliméricas tem promovido maior flexibilidade, sensibilidade e seletividade por analitos mais polares, estendendo os limites das aplicações da técnica SBSE (NOGUEIRA, 2012).

Neng et al. (2007) empregaram poliuretano como nova fase polimérica para SBSE, sendo aplicada a amostras de água contaminadas com atrazina, 2,3,4,5-tetraclorofenol e fluoreno, tendo o seu desempenho avaliado por LC e GC acoplado à espectrometria de massas (MS, *Mass Spectrometry*). Melo et al. (2009) desenvolveram um recobrimento polimérico de PDMS modificado com polipirrol para extração de antidepressivos em amostras de plasma, seguido de separação e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV-Vis (HPLC-PDA), obtendo-se limites de quantificação (LOQ) de 20 a 50 ng mL⁻¹. Outra possibilidade para modificação das fases poliméricas é o uso da síntese sol-gel para introdução de grupamentos funcionais na matriz de PDMS, obtendo polímeros de características desejadas para a extração de determinados analitos. Lambert et al. (2005) combinaram partículas de alquidiolsílica (ADS) e material de acesso restrito (RAM) para o recobrimento de uma barra sortiva biocompatível para fluídos biológicos. Esta combinação de fases proporcionou, em etapa única, o fracionamento de componentes protéicos e possibilitou a extração de cafeína e seus respectivos metabólitos. Os polímeros molecularmente impressos (MIPs) também tem sido sintetizados e seu emprego avaliado para o processo SBSE (NOGUEIRA, 2012).

1.4 A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

As técnicas de extração ou pré-concentração permitem que, na análise dos componentes de interesse, obtenha-se uma separação cromatográfica adequada, ou seja, com boa resolução, em um tempo razoável de análise. De fato, a cromatografia é um método físico-químico de separação baseado na migração diferencial de componentes de uma mistura, decorrente da distinta distribuição destes entre a fase estacionária e a fase móvel (DEGANI, BASS, VIEIRA, 1998; QUEIROZ, COLLINS, JARDIM, 2001).

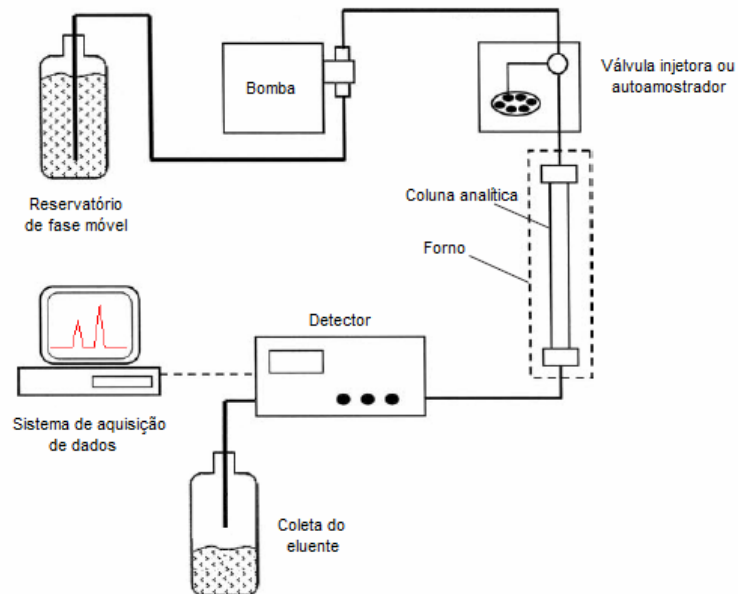
Em 1906, o botânico russo Mikhael S. Tswett foi o primeiro a relatar a resolução de substâncias de extratos de plantas utilizando a cromatografia como

método de separação. Ao longo dos anos, a técnica cresceu com a cromatografia gasosa e, somente na década de 1950, a cromatografia líquida evoluiu grandemente em termos de instrumentação e fases estacionárias (VON MÜHLEN, LANÇAS, 2004; SILVA et al., 2004). A partir dos anos 80 e ao longo dos anos subsequentes, buscou-se melhorar a resolução dos modos cromatográficos, consolidando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, do inglês HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*) com a elevada sofisticação instrumental conhecida dos dias atuais.

Hoje os sistemas de HPLC são constituídos essencialmente de uma bomba de alta pressão, responsável por empurrar a fase móvel ao longo do sistema; a válvula de injeção ou autoamostrador, utilizados para a introdução da amostra; a coluna analítica, considerada o coração do sistema cromatográfico, no qual acontece a separação dos componentes da amostra; o detector, o qual responde a mudanças da concentração do analito durante a corrida cromatográfica e, na saída do detector, tem-se o sistema de gerenciamento dos experimentos e aquisição de dados, responsável pelo armazenamento dos resultados e produção de gráficos, conhecidos como cromatogramas. A Figura 4 apresenta um esquema básico dos módulos constituintes de um sistema de LC (VON MÜHLEN, LANÇAS, 2004; SNYDER, KIRKLAND, DOLAN, 2010).

Os sistemas de bombeamento são responsáveis pelo bombeamento da fase móvel, carregando a amostra do sistema de injeção para a coluna e o detector. Estes são projetados para operar a elevadas pressões (até 6000 psi), usualmente trabalhando-se na faixa de 2000 a 3000 psi. As bombas de alta pressão devem gerar vazões de 0,1 a 10 mL min⁻¹, com ausência de pulsação, apresentando ainda resistência à corrosão para ampla gama de solventes e reprodutibilidade relativa menor ou igual a 0,5%. Existem basicamente dois principais tipos de sistemas de bombeamento: à pressão constante (com ou sem amplificação pneumática) e à volume constante (bombas tipo seringa ou de pistão recíprocante). As bombas de pistão recíprocante de duplo pistão são as mais empregadas nos equipamentos de LC comerciais devido a sua precisão e exatidão, rápida estabilização da vazão da fase móvel, capacidade de operação contínua e facilidade de criação de gradiente (SKOOG, 2005; COUTINHO, 2008; SNYDER, KIRKLAND, DOLAN, 2010).

Figura 4 - Módulos básicos de um sistema de cromatografia líquida.



Fonte: Adaptado de Snyder, Kirkland, Dolan (2010).

As válvulas de injeção ou autoamostradores são responsáveis pela introdução da amostra no sistema cromatográfico, podendo operar pneumática ou eletricamente. Embora inicialmente projetadas para uso manual, as válvulas de injeção de amostra fazem parte atualmente de injetores automáticos conhecidos como autoamostrador. Os tipos mais comuns são válvulas com *loop* externo e as válvulas com *loop* interno. Os *loops* são pequenas alças de amostragem feitas de aço inoxidável ou PEEK (poliéter-éter-cetona), no interior dos quais a amostra é carregada. As válvulas mais empregadas são as válvulas de injeção de seis vias (*six-port*), caracterizadas por serem de *loop* externo e intercambiáveis, permitindo a escolha do volume de injeção; em geral, de 5 a 500 μL de amostra (SKOOG, 2005; SNYDER, KIRKLAND, DOLAN, 2010; MONTEIRO, 2010).

As colunas analíticas são tubos cilíndricos de aço inoxidável, PEEK ou sílica fundida, de comprimento e diâmetro interno variados, que mantém fixa a fase estacionária. Considerando o formato e a disposição da fase estacionária ao longo do tubo, as colunas são divididas em três classes: empacotadas, tubulares abertas e monolíticas. Nas colunas tubulares abertas, um recobrimento fino e quimicamente ligado cobre toda a superfície interna da coluna. As colunas empacotadas são aquelas compostas por um suporte rígido e uma fase estacionária ligada, preenchendo toda a extensão da coluna. As primeiras colunas empacotadas para HPLC possuíam partículas de tamanho irregular em torno de 30 μm . O

surgimento, e crescente uso de colunas empacotadas com partículas de 5 a 10 μm , possibilitou melhores separações cromatográficas pelo maior número de pratos e, conseqüentemente melhores resoluções. Atualmente, as colunas mais comumente empregadas são as octadeciladas (C18) e os tamanhos de partículas variam entre 3 – 5 μm para colunas de HPLC e 1,5 – 3,0 μm para cromatografia líquida de ultra-alta performance (UHPLC, do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography*). As colunas monolíticas são constituídas de meios porosos contínuos utilizados como fases estacionárias e constituídos de pequenos domínios e longos canais. Os leitos monolíticos podem ser preparados a partir de uma diversidade de monômeros orgânicos ou inorgânicos, como sílica, zircônia, carbono, titânio; sendo classificados de acordo com a natureza do precursor, existindo três classes principais: monolitos à base de sílica, polímeros orgânicos e híbridos. A partir dos anos 2000, colunas monolíticas à base de sílica se tornaram disponíveis comercialmente e isto propiciou a popularização das fases monolíticas, havendo centenas de publicações na literatura em diversas áreas (HJERTÉN, LIAO, ZHANG, 1989; SILVA et al., 2004; SKOOG, 2005; FARIA et al., 2006; SNYDER, KIRKLAND, DOLAN, 2010; MONTEIRO, 2010; LIANG, ZHANG, ZHANG, 2013).

Os detectores são transdutores com a habilidade de conversão de uma propriedade física ou química apresentada por uma substância em sinal elétrico, que será relacionado à concentração da referida substância. É desejável que um detector tenha alta sensibilidade; apresente resposta linear ao aumento de concentração do analito; não seja afetado por mudanças de temperatura, vazão e composição da fase móvel; e não contribua para alargamento dos picos cromatográficos. Os detectores mais utilizados são o de índice de refração (RI), por possuir seletividade universal e os espectrofotométricos na região ultravioleta-visível (UV-Vis ou PDA). Os detectores de fluorescência (FD), conhecidos como fluorímetros, são mais sensíveis e seletivos que os detectores de UV-Vis ou RI pois são capazes de mensurar a intensidade de fluorescência emitida pelos analitos quando excitados por radiação UV. Devida a elevada sensibilidade, os fluorímetros são muito utilizados para análise de traços quando o tamanho da amostra é reduzido ou a concentração do analito é extremamente baixa (até 10^{-11} g mL⁻¹). As principais aplicações de LC seguida de detecção fluorométrica são análises de amostras biológicas e ambientais, produtos farmacêuticos, alimentos e combustíveis fósseis (SKOOG, 2005; SNYDER, KIRKLAND, DOLAN, 2010).

Inúmeros são os relatos de aplicação dos sistemas de HPLC e da detecção por fluorescência para análise de amostras biológicas, como sangue total, plasma, urina, esperma, entre outros. Raggi et al. (1998) determinaram fluoxetina e norfluoxetina em plasma utilizando SPE como técnica de extração e HPLC com detecção por fluorescência. Bagheri et al. (2011) produziram nanopartículas de Fe_3O_4 recobertas de dodecilsulfato de sódio para extração de fluoxetina a partir de urina e realizaram a detecção diretamente em espectrofluorímetro. Unceta et al. (2007) separaram misturas racêmicas de fluoxetina e norfluoxetina por HPLC com detecção no UV-Vis (PDA) e no fluorescência, empregando derivatização quiral com *R*-1-(1-naftil)etil-isocianato. Silva et al. (2009) desenvolveram um capilar de SPME recoberto de polipirrol para extração de fluoxetina e norfluoxetina em amostras de plasma, realizando separação enantiomérica dos estereoisômeros *R*- e *S*- dos analitos por HPLC e detecção por fluorescência.

1.5 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi otimizar as variáveis do preparo de amostra por mSBSE, empregando planejamento experimental, e validar o método de extração com quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FD) para posterior monitoramento terapêutico dos níveis de FLU em plasma de pacientes depressivos.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

O polidimetilsiloxano (PDMS) e seu agente de cura foram adquiridos da Dow Corning Corporation (Midland, MI, EUA). O cloridrato de fluoxetina (FLU) foi obtido da United States Pharmacopeia (Rockville, EUA). Acetonitrila e metanol, ambos grau HPLC, foram provenientes da J. T. Baker (Ecatepec de Morelos, México). Acetato de etila (grau p.a.) foi obtido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A água ultrapura com resistividade $18,2 \mu\Omega \text{ cm}^{-1}$ foi obtida de um sistema Milli-Q[®] (Millipore, Billerica, MA, EUA). A solução tampão fosfato de sódio $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 3,07) foi preparada a partir do sal NaH_2PO_4 (Nuclear, Diadema, São Paulo, Brasil) e filtrada em membrana de acetato de celulose $0,22 \mu\text{m}$ (Sartorius Stadies, Goettigen, Alemanha). A solução tampão borato de sódio $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 9,00 e pH 10,00) foi feita a partir do sal $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ (Mallinckrodt Baker, Paris, EUA). Para ajuste de pH das soluções tampão, utilizou-se solução de HCl ou NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (Vetec Química, Xerém, Rio de Janeiro, Brasil) medidos em pHmetro/Ionmeter 781 (Metrohm, Herisau, Suíça), em sala climatizada a 20°C .

2.2 AMOSTRAS DE PLASMA

2.2.1 Coleta das Amostras

As coletas das amostras de plasma foram realizadas no Campus da Universidade Estadual de Londrina (UEL) pelo Setor de Coleta do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU). Este projeto foi devidamente inserido na Plataforma Brasil e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEL (CAAE: 50939615.8.0000.5231; nº 1.395.401).

O sangue foi coletado por meio de punção venosa com agulha e tubos de coleta de sangue a vácuo EDTA 4 mL, todos estéreis e descartáveis, não sendo necessário o jejum dos participantes. As amostras foram mantidas sob refrigeração (Dako, Campinas, São Paulo, Brasil) no Setor de Coletas do AEHU, por no máximo 12 h, até o processamento.

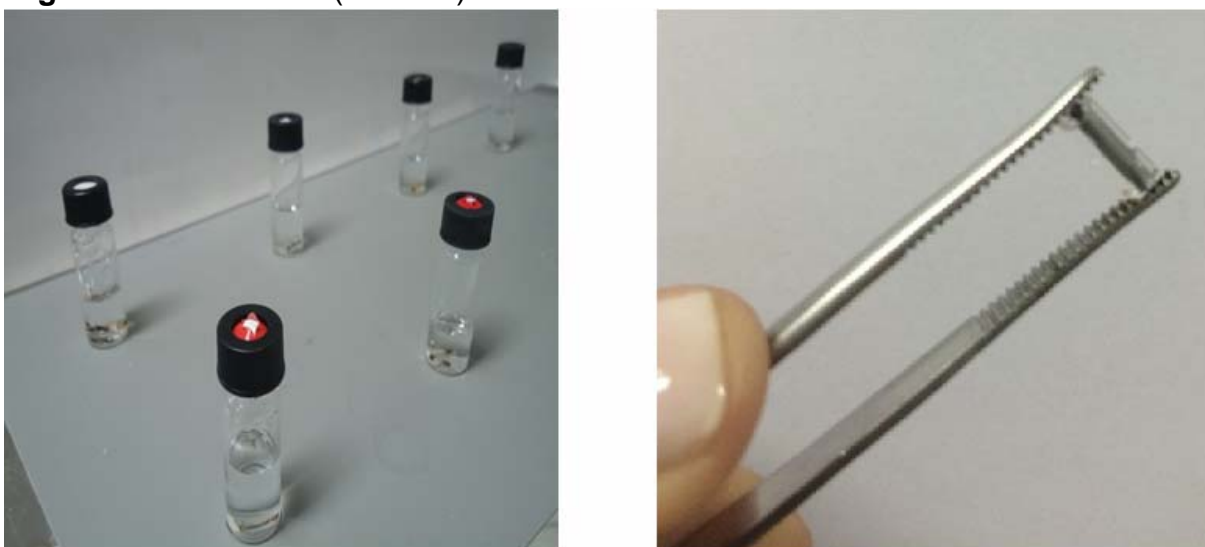
2.2.2 Processamento das Amostras de Plasma

O plasma foi obtido por centrifugação do sangue total a 3000 rpm (T23 - Janetzki, Wallhausen, Alemanha) durante 10 min. Em seguida, o sobrenadante (plasma) foi coletado. Os plasmas dos participantes em ausência do uso de FLU foram utilizados para o preparo do *pool* da matriz biológica. O *pool* da matriz foi obtido por meio da mistura do plasma de 18 indivíduos e, em seguida, a mistura foi aliquoteada em *ependorfs* de 2,0 mL. Todo o material biológico foi armazenado em freezer a -6 °C (Dako, Campinas, São Paulo, Brasil) até o momento de sua utilização, quando foi descongelado em temperatura ambiente e centrifugado durante 10 min a 6000 rpm (Benchmark Scientific, Edison, NJ, EUA).

2.3 OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO SBSE – SORÇÃO E DESSORÇÃO

Para a etapa de sorção foram adicionados 10 μL de padrão de FLU 6250,00 ng mL^{-1} à 240 μL de plasma branco em *vial*, para que a concentração plasmática do fármaco fosse 250,00 ng mL^{-1} . Em seguida, acrescentou-se 3750 μL de tampão borato de sódio (pH 9,00) e a micro barra mSBSE (Figura 5), desenvolvida no Laboratório de Desenvolvimento e Automação Analítica da UEL a partir de PDMS comercial, sob depósito de patente (protocolo BR-10-2014-022265-0).

Figura 5 - Micro barra (mSBSE) desenvolvida.



Fonte: Próprio autor (2016).

O pH selecionado para os experimentos de sorção foi fixado em 9,0 levando em conta estudos da literatura (CHAVES et al., 2007; MELO et al., 2009) e anteriores (MARQUES, 2013), considerando que o meio básico favorece a protonação do carbono anomérico da molécula de FLU proporcionando uma melhor partição no PDMS.

As variáveis tempo e temperatura da etapa de extração da sorção foram inicialmente avaliadas por um planejamento fatorial 2^2 , apresentado na Tabela 1. Após os estudos de otimização a velocidade de agitação magnética para a etapa de extração da sorção foi fixada no nível médio, bem como estabelecidas as condições da etapa de dessorção utilizando 4000 μL de solução de metanol:acetonitrila (75:25, v/v) (de acordo com estudo de MARQUES, 2013), à 50°C, com agitação em velocidade média por 50 min em agitador magnético multiponto MS-H-S10 (Scilogex, Rocky Hill, EUA).

Tabela 1 - Delineamento dos experimentos do planejamento fatorial 2^2 para as variáveis temperatura e tempo na etapa de sorção da extração por mSBSE de fluoxetina em plasma.

Ensaio	Variáveis não codificadas		Variáveis codificadas	
	Temperatura/°C	Tempo/min	x_1	x_2
1	40	60	- 1,0	1,0
2	60	20	1,0	- 1,0
3	60	60	1,0	1,0
4	40	20	- 1,0	- 1,0

Em seguida, as barras mSBSE foram removidas da solução de dessorção com o auxílio de uma pinça imantada, segurando pelas laterais evitando o contato com o PDMS e, as amostras evaporadas (40°C) lentamente em chapa aquecedora (Nova Técnica, Piracicaba, Brasil). O resíduo foi então ressuscendido em 250 μL da solução de dessorção e injetado em cromatógrafo a líquido de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FD). As concentrações de FLU foram obtidas pelo método do padrão externo. Para evitar *carryover* das microbarras, uma etapa de limpeza com 2 mL de solução de metanol:acetonitrila (20:80, v/v) foi feita durante 30 min entre cada ciclo de extração - sorção/dessorção.

Um planejamento composto central (Tabela 2) foi delineado para as variáveis tempo e temperatura de sorção, mantendo-se as mesmas condições fixadas para o planejamento fatorial. Novamente, os resultados de concentrações de

FLU foram obtidos por meio do método de padrão externo e devidamente avaliados pelo *software* Statística 8.0 (StatSoft, Inc). As condições ótimas da etapa de sorção da extração foram determinadas estimando-se o parâmetro de desejabilidade e confirmadas pela verificação da validade do modelo preditivo (ponto ótimo).

Tabela 2 - Variáveis independentes e níveis de variação do planejamento composto central na etapa de sorção da extração empregando mSBSE de fluoxetina em plasma humano.

Variáveis independentes	Níveis de variação		
	-1,0	0,0	+1,0
x_1 = Temperatura (°C)	40	50	60
x_2 = Tempo (min)	20	40	60

Em seguida, a influência de três diferentes níveis de velocidade de agitação magnética (mínima, média e máxima) na etapa de sorção foi avaliada nas condições do ponto ótimo anteriormente estabelecido, com 5 repetições ($n=5$). As velocidades de agitação dos níveis atribuídos (mínimo, médio e máximo) foram estimadas utilizando-se um tacômetro digital por contato (MDT-2238, Minipa, São Paulo, Brasil). Deste modo, as velocidades de agitação magnética estimadas para os níveis mínimo, médio e máximo foram de 360, 840 e 1200 rpm (com erro de $\pm 5\%$), respectivamente.

Avaliou-se também a cinética da etapa de dessorção para os tempos de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 min, com 5 repetições ($n=5$), sob agitação magnética na velocidade de agitação ótima. Estudou-se ainda a influência do modo de dessorção: agitação magnética ou ultrassonicação, a 37 kHz (Elmasonic P, Singen, Alemanha), nas condições ótimas preestabelecidas para ambas etapas de extração - sorção e dessorção por mSBSE.

2.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO MSBSE-HPLC-FD PARA FLU EM PLASMA

O método de extração - sorção e dessorção por mSBSE de FLU em plasma seguido da determinação quantitativa cromatográfica foi validado de acordo com as figuras de mérito previstas na Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

A linearidade foi avaliada para a faixa de trabalho de 25,00 a 250,00

ng mL⁻¹. A exatidão foi determinada por meio de ensaio de recuperação para a concentração plasmática de 150,00 ng mL⁻¹ de FLU, considerando a ausência de sinal analítico no branco da matriz no tempo de retenção da FLU, calculada pela Equação 1. A precisão intradia foi avaliada pela repetitividade de 6 análises consecutivas da amostra com concentração plasmática de 150,00 ng mL⁻¹ e a precisão intermediária durante 3 dias distintos de análise, ambas obtidas pela Equação 2. Os limites de detecção (LOD, *Limit of Detection*) e quantificação (LOQ, *Limit of Quantification*) foram calculados a partir das Equações 3 e 4, respectivamente. A especificidade e seletividade do método foram avaliadas para amostras de padrão em solvente, plasma adicionado de padrão e plasma sem adição de padrão e confirmada pelo ensaio de recuperação. A robustez do método cromatográfico foi avaliada por variações da vazão no intervalo de 0,80 a 1,2 mL min⁻¹, temperatura da coluna de 30 e 40°C e tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ em pH 3,07 e pH 4,07.

$$\text{Recuperação} = \frac{CME}{CT} \times 100\% \quad (1)$$

$$CV = \frac{DP}{CMD} \times 100\% \quad (2)$$

$$LOD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad (3)$$

$$LOQ = \frac{DP_a \times 10}{IC} \quad (4)$$

em que *CME* é a concentração média experimental; *CT* é a concentração teórica; *CV* é o coeficiente de variação (em %); *DP* é o desvio padrão das medidas consecutivas ($n=6$); *CMD* é a concentração média determinada ($n=6$); *DP_a* é o desvio padrão do intercepto e *IC* é a inclinação da curva analítica.

2.5 COMPARAÇÃO COM MÉTODO LLE-HPLC-FD PARA FLU EM PLASMA

Para comparar o método mSBSE proposto neste trabalho, adaptou-se uma extração líquido-líquido (LLE, *Liquid Liquid Extraction*) descrita e validada na literatura para a FLU (DJORDJEVIC et al., 2005). Para isto, em 250 μL de plasma branco enriquecido com distintas concentrações de FLU adicionou-se 250 μL de tampão borato de sódio 50,0 mmol L^{-1} (pH 10,00). Em seguida, foram adicionados 1250 μL de acetato de etila para extração dos fármacos e a mistura foi agitada por 20 min em vórtex (Warmnest, Curitiba, Paraná, Brasil). Após centrifugação de 10 min a 6000 rpm (Benchmark Scientific, Edison, NJ, EUA), a fase orgânica (sobrenadante) foi separada e evaporada (40°C) lentamente em chapa aquecedora (Nova Técnica, Piracicaba, Brasil). O resíduo foi ressuspenso em 250 μL de fase móvel e injetado no sistema cromatográfico (HPLC-FD). Três curvas analíticas foram construídas em três dias distintos para as concentrações de 25,00; 50,00; 100,00; 150,00; 200,00 e 250,00 ng mL^{-1} .

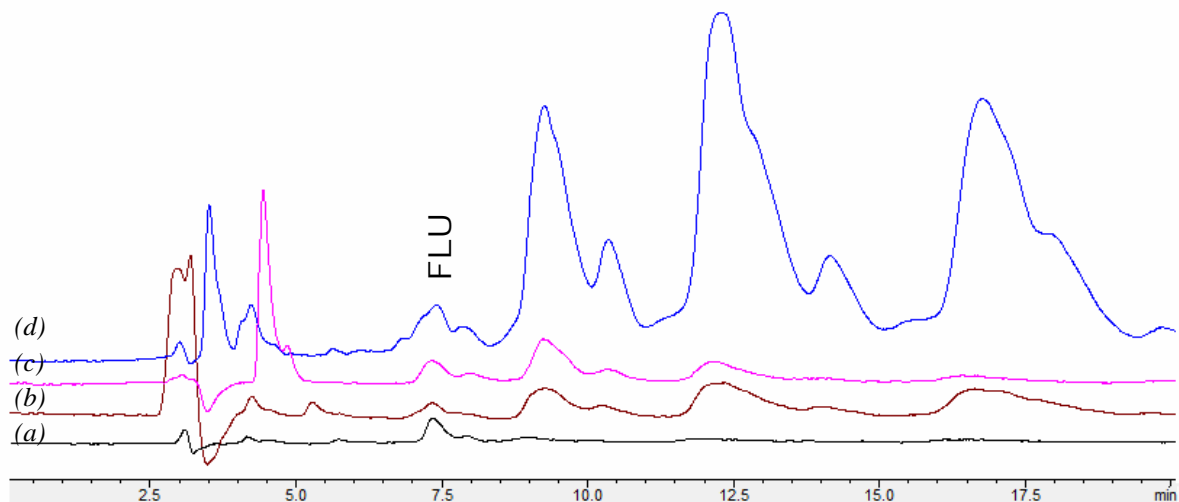
2.6 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) empregado constituiu-se de cromatógrafo a líquido Shimadzu LC-20A Prominence (Quioto, Japão) composto por bomba LC-20AT com desgaseificador DGU-20A5; autoamostrador SIL-20AC; forno para coluna CTO-20A acoplada a detector de fluorescência (FD) RF-10AXL e interface CBM-20A. Utilizou-se uma coluna C8 Microsorb[®] (250 x 4,6 mm, 5 μm , Varian, Palo Alto, CA, EUA), mantida a 30°C, sendo a fase móvel constituída de acetonitrila: tampão fosfato de sódio 50,0 mmol L^{-1} (pH 3,07) (45:55, v/v), sendo a eluição em modo isocrático à vazão de 1,0 mL min^{-1} e o volume de injeção de 20,0 μL . A intensidade de emissão de fluorescência foi monitorada a 290 nm (com excitação a 230 nm). O tempo de corrida foi de 20 min. Os dados foram adquiridos pelo *software* LC Solution (Shimadzu, Quioto, Japão).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cromatogramas obtidos para as amostras de FLU extraídas de plasma humano pelos métodos proposto por mSBSE e referência por LLE são mostrados na Figura 6, juntamente ao cromatograma de um padrão de FLU em solvente e em matriz plasma. Observa-se que o tempo de retenção (t_R) para a FLU foi de 7,4 min utilizando as condições cromatográficas anteriormente descritas. Os cromatogramas estão plotados na mesma escala (mV), apenas estão deslocados no eixo y, para melhor visualização.

Figura 6 - Cromatogramas das análises de FLU ($t_R = 7,4$ min): (a) Padrão 250,00 ng mL⁻¹ dissolvido na fase móvel; (b) amostra isenta de matriz adicionada de padrão 250 ng mL⁻¹ extraída por mSBSE; (c) amostra em matriz de plasma adicionada de padrão 250 ng mL⁻¹ extraída por mSBSE e (d) amostra em matriz de plasma adicionada de padrão 250 ng mL⁻¹ extraída por LLE.



Condições cromatográficas: fase móvel composta de acetonitrila: tampão fosfato de sódio 50,0 mmol L⁻¹ (pH 3,07) (45:55, v/v) em eluição isocrática na vazão de 1,0 mL min⁻¹; volume de injeção de 20,0 µL; coluna C8 Microsorb® (250 x 4,6 mm, 5 µm) mantida a 30°C; detecção por fluorescência ($\lambda_{excitação} = 230$ nm, $\lambda_{emissão} = 290$ nm); tempo de corrida de 20 min.

Fonte: Próprio autor (2016).

Verifica-se que o método proposto usando mSBSE (Figura 6c) apresentou menos picos, demonstrando uma melhor limpeza (*clean-up*) dos interferentes/compostos extraídos da matriz para as amostras, se comparado à LLE (Figura 6d).

Chaves et al. (2007) estudaram o processo SBSE para a extração

de FLU em plasma através de experimentos univariados. Foi avaliada a influência das variáveis pH e força iônica da matriz, temperatura da etapa de sorção, composição do meio de dessorção (solventes), tempo da etapa de dessorção, número de etapas e modo de dessorção. Melo et al. (2009) desenvolveram uma barra de PDMS modificado com polipirrol e também estudou, de maneira univariada, as condições do processo SBSE, como tempo e temperatura de extração, pH da matriz e tempo de dessorção. Os resultados de ambos os estudos são relevantes, entretanto algumas das condições experimentais avaliadas poderiam ser estudadas por planejamento experimental, o que permite determinar as condições ótimas do processo SBSE com um mínimo de experimentos, ainda existindo a possibilidade de se verificar as interações entre as variáveis do processo.

A Tabela A1, contida no Apêndice A - Informação Suplementar, apresenta a função resposta (Y) para o planejamento central composto para a etapa de sorção de FLU em plasma humano. Estes dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) para as variáveis independentes: temperatura (x_1) e tempo (x_2), e estão mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 - ANOVA para as variáveis independentes da etapa da sorção mSBSE de FLU em plasma humano

Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Teste F	p
(1) Temperatura (L)*	1194,5	1	0,31051	0,58523
Temperatura (Q)**	100195,3	1	26,04667	0,00003
(2) Tempo (L)*	1007,6	1	0,26192	0,61347
Tempo (Q)**	29535,1	1	7,67793	0,01062
1L por 2L	2426,2	1	0,63072	0,43487
Erro puro	92322,3	26		
Total	249038,7	29		

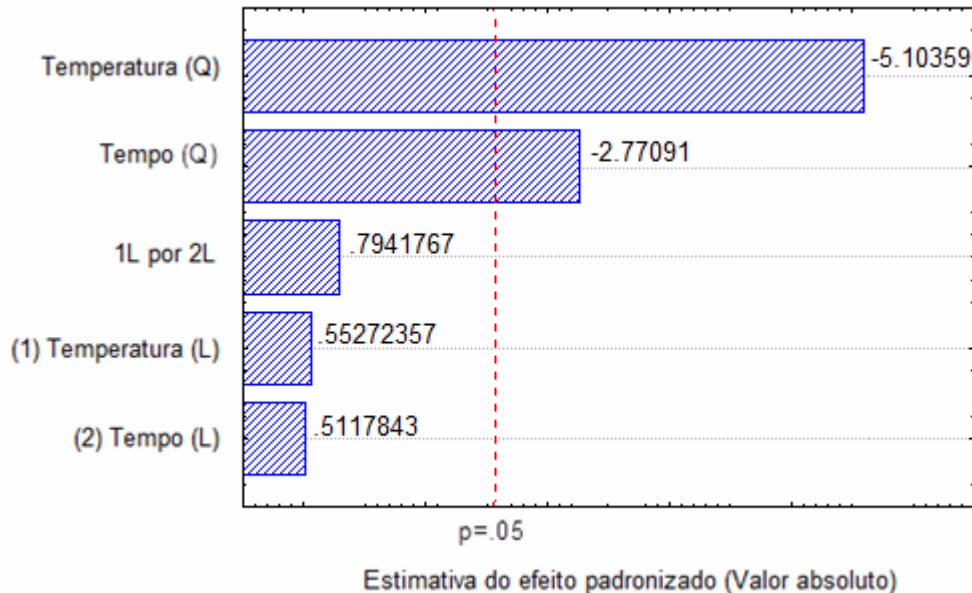
L=efeito linear; **Q=efeito quadrático.

Os dados contidos na Tabela 3 mostram que os efeitos quadráticos das variáveis x_1 e x_2 foram significativos ($p < 0,05$) para as concentrações de FLU. O diagrama de Pareto, apresentado na Figura 7, mostra que a interação entre as variáveis não é significativa em nível de 5%. Nota-se também que o efeito quadrático de x_1 é muito mais significativo para o modelo se comparado ao efeito quadrático de x_2 . O erro puro do modelo não foi significativo ($p < 0,05$).

O coeficiente de determinação (r^2) foi igual a 0,6293 indicando que 62,93% dos dados experimentais puderam ser descritos pelo modelo polinomial

proposto. O ajuste do modelo (r^2_{aj}) foi de 0,5520, sendo que o erro puro não se mostrou significativo em nível de 5% de confiança.

Figura 7 - Diagrama de Pareto para as variáveis x_1 e x_2 do planejamento composto central.



Fonte: Próprio autor (2016).

O modelo polinomial (Y) que representa a sorção na etapa de extração de FLU em plasma pode ser representado pela Equação 5:

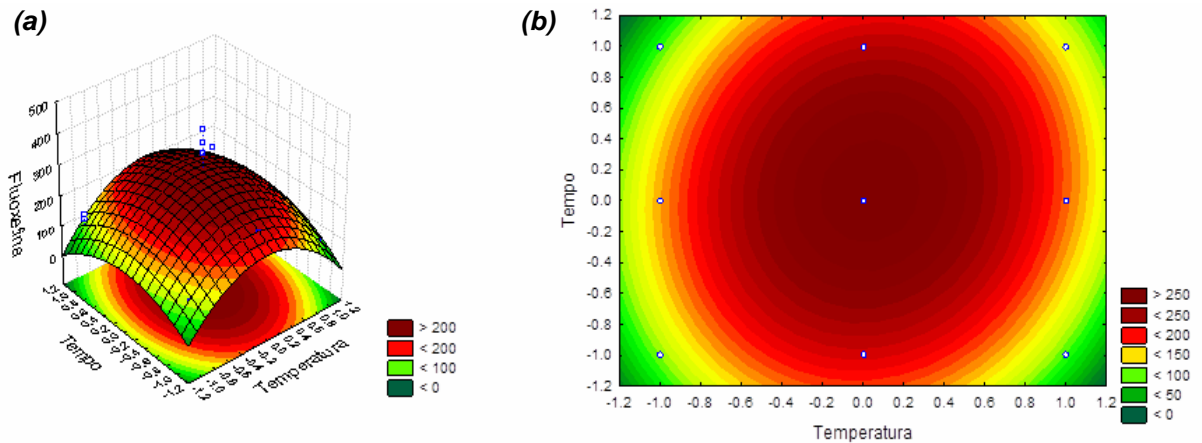
$$Y = 8,146 x_1 - 119,640 x_1^2 + 7,482 x_2 - 64,956 x_2^2 + 14,219 x_1 x_2 + 287,053 \quad (5)$$

em que x_1 e x_2 são as variáveis codificadas e representam a temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e tempo (min), respectivamente.

A partir do modelo polinomial proposto (Equação 5), construiu-se a superfície de resposta (Figura 8) para possibilitar uma melhor visualização das distintas condições de sorção de FLU em plasma humano. Na Figura 8a, observa-se que as melhores condições de sorção de FLU (Y) ocorreram em regiões de temperatura (x_1) próxima de 50°C e tempo (x_2) ao redor de 40 min, área mais escura do gráfico. A Figura 8b permite melhor visualização da região onde ocorreu a maior extração na etapa de sorção de FLU (Y) das amostras de plasma, ou seja, quando a temperatura está entre $x_1 = -0,80$ (32°C) e $x_1 = +0,80$ (58°C) e tempo $x_2 =$

-0,80 (24 min) e $x_2 = +0,80$ (56 min).

Figura 8 - (a) Superfície de resposta para extração - etapa de sorção de FLU (ng mL^{-1}) em plasma humano, em função das variáveis independentes temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e tempo (min); (b) região de maior extração - etapa de sorção de FLU (ng mL^{-1}) em vermelho e pontos experimentais indicados em branco.

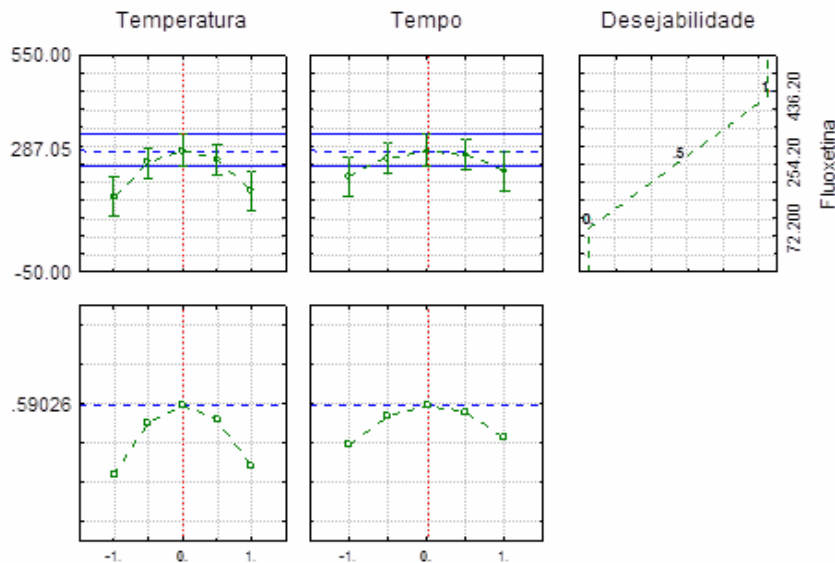


Função resposta (Y):
 $Y = 8,146 x_1 - 119,640 x_1^2 + 7,482 x_2 - 64,956 x_2^2 + 14,219 x_1 x_2 + 287,053$; que x_1 e x_2 são as variáveis codificadas e representam a temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e tempo (min), respectivamente.

Fonte: Próprio autor (2016).

O parâmetro de desejabilidade (Figura 9) indicou que a máxima extração na etapa de sorção de FLU ocorreu sob as condições de temperatura de 50°C ($x_1 = 0,0$) e tempo de 40 min ($x_2 = 0,0$).

Figura 9 - Parâmetro de desejabilidade estimado na condição ótima de temperatura e tempo de extração - etapa de sorção de FLU em plasma humano.



Fonte: Próprio autor (2016).

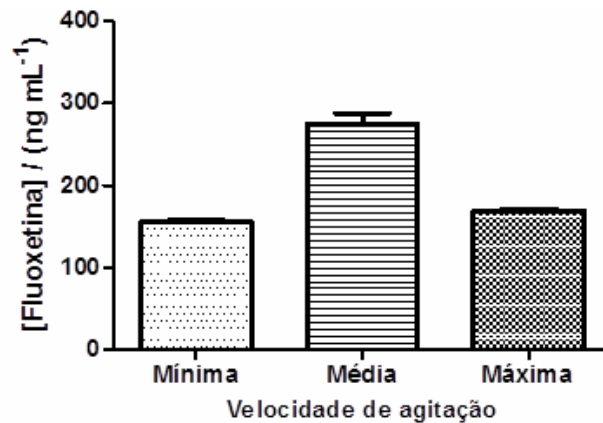
Deste modo, o valor predito de concentração de FLU para a condição ótima de extração na etapa de sorção (calculado a partir da Equação 5) foi de $287,05 \text{ ng mL}^{-1}$ e os resultados experimentais, obtidos pelo método do padrão externo, para o ponto ótimo foram de $288,22 \pm 13,07 \text{ ng mL}^{-1}$ ($n=3$). Não foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os resultados a partir do ponto ótimo de extração, corroborando a validade da Equação 5 para descrever o planejamento composto central. A curva de resultados experimentais em função dos resultados preditos (Figura A1) mostra que o modelo apresentou baixa dispersão, não sendo verificada a existência de tendências, confirmada pelo gráfico do resíduo do modelo (Figura A2). Ambas as Figuras encontram-se no Apêndice A - Informação Suplementar deste trabalho.

É interessante observar que, apesar da SBSE ser uma técnica de equilíbrio, o ponto máximo da equação polinomial, a qual mostra a máxima concentração de FLU extraída na etapa de sorção do plasma, é um ponto de máximo para este polinômio. Sendo assim, em condições distintas daquelas descritas pelo parâmetro de desejabilidade, as concentrações extraídas por sorção de FLU serão menores. Deste modo, a partir da finalização dos experimentos do planejamento composto central, utilizaram-se as condições ótimas de extração para etapa de sorção (40 min à 50°C) para a realização dos experimentos subsequentes.

O estudo da influência dos níveis de agitação magnética para a

etapa de sorção (Figura 10) empregando FLU na concentração plasmática de 250,00 ng mL⁻¹ mostrou que a velocidade média de agitação magnética maximiza a extração do analito da matriz plasmática.

Figura 10 - Estudo dos níveis de velocidade de agitação para extração por mSBSE na etapa de sorção de FLU de plasma humano ($n=5$) a partir da concentração plasmática de 250,00 ng mL⁻¹.



Fonte: Próprio autor (2016).

Constatou-se diferença significativa da velocidade média de agitação ($p < 0,05$) em relação às velocidades mínima e máxima (Tabela A2 no Apêndice A - Informação Suplementar). Aplicando-se o teste de Tukey, não se verificou diferença significativa entre as sorções de FLU utilizando as velocidades mínima e máxima, em nível de 5% de confiança. Sugere-se que a máxima concentração de FLU é obtida na velocidade média de agitação magnética, pois esta promove transporte de massa por convecção adequado para máxima sorção do analito na fase polimérica extratora, enquanto não favorece o início do processo de dessorção, por transporte de massa por difusão.

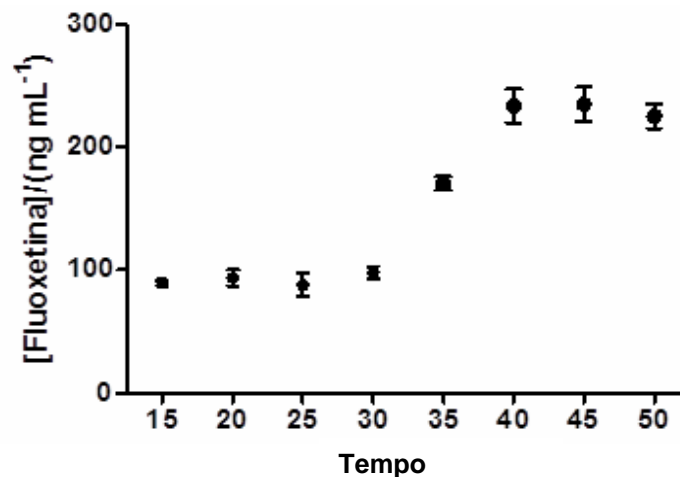
A curva de cinética de dessorção (Figura 11) inicialmente apresenta um patamar de concentração até o tempo de 30 min. No intervalo de 30 a 40 min, ocorre um aumento significativo da dessorção descrita pela Equação 6, o qual segue um modelo cinético de primeira ordem, expresso por:

$$\ln [FLU]_{30-40 \text{ min}} = 0,0864 \cdot t_{30-40 \text{ min}} + 2,0332 \quad (6)$$

sendo $r^2 = 0,9273$ e $r = 0,9629$, demonstram bom ajuste e linearidade ao modelo

escolhido, adequado para descrever o aumento da concentração de FLU na etapa de dessorção no intervalo de 30 a 40 min. Após 40 min, verifica-se a existência de outro patamar, indicando que as concentrações de FLU não mais se alteram.

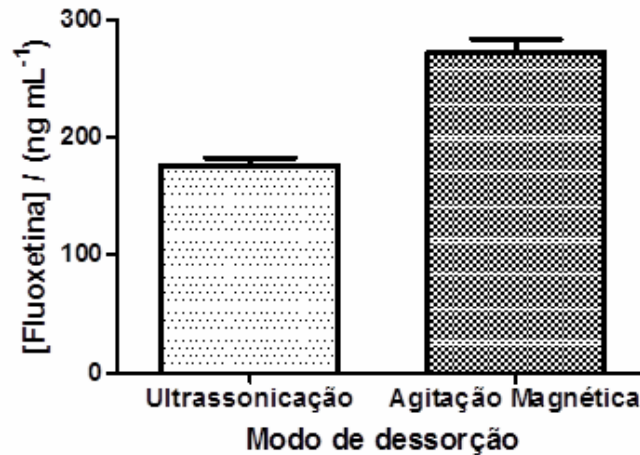
Figura 11 - Curva de cinética na etapa de dessorção da extração de FLU de plasma humano empregando mSBSE ($n=5$) a partir da concentração plasmática de $250,00 \text{ ng mL}^{-1}$, utilizando-se agitação magnética média e temperatura de 50°C .



Fonte: Próprio autor (2016).

A avaliação do modo de dessorção (Figura 12) mostrou que as concentrações de FLU obtidas a partir da dessorção por agitação magnética são significativamente maiores que as por ultrassonicação, em nível de 5% de confiança (Tabela A3 do Apêndice A - Informação Suplementar). Ademais, o modo de dessorção por agitação magnética traz praticidade ao método desenvolvido, pois permite utilizar o mesmo equipamento para o processo mSBSE completo, além da etapa de dessorção por ultrassonicação poder danificar a superfície polimérica das microbarras de acordo com Lambert et al. (2005).

Figura 12 - Concentração da fluoxetina por diferentes modo de dessorção (ultrassom a 37 kHz e agitação magnética média) utilizando mSBSE na extração de FLU em plasma humano ($n=5$) a partir da concentração plasmática de $250,00 \text{ ng mL}^{-1}$, utilizando-se temperatura de 50°C .



Fonte: Próprio autor (2016).

A validação do método mSBSE-HPLC-FD contemplou a faixa dinâmica de trabalho de $25,00$ a $250,00 \text{ ng mL}^{-1}$, obtendo-se os modelos de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados apresentados nas Equações 7 e 8 que descrevem, respectivamente, a curva de padrões de FLU isenta de matriz e em matriz plasma (Figura 13):

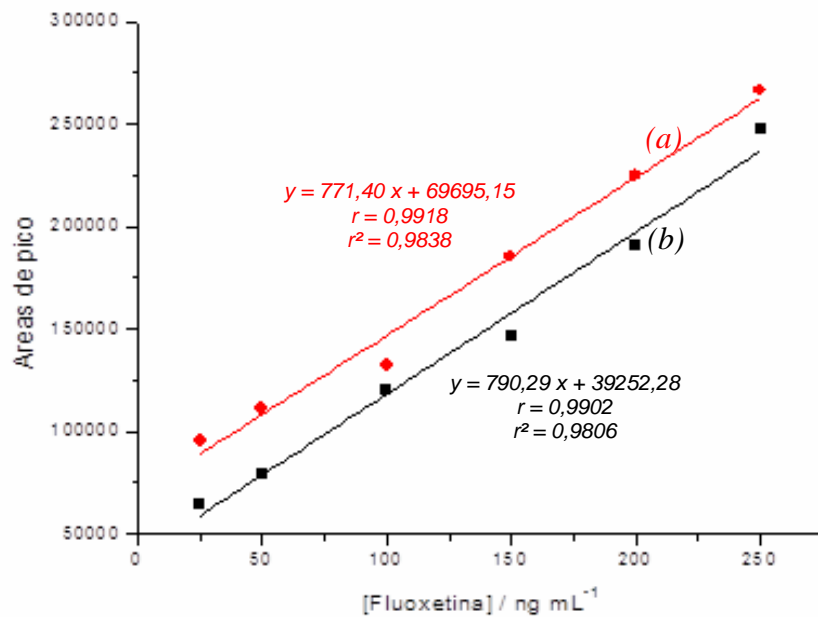
$$y = 790,29 x + 39252,28 \quad (7)$$

$$y = 771,40 x + 69695,15 \quad (8)$$

em que y representa a área de pico e x a concentração de FLU (em ng mL^{-1}).

Os coeficientes de correlação, r , e determinação, r^2 , encontram-se na Tabela 4 e, como ambas as curvas, apresentam $r > 0,99$, pode-se dizer que é linear na faixa dinâmica de trabalho escolhida. Também vê-se que $r^2 > 0,98$ para as duas curvas, indicando que os resultados obtidos se ajustam ao modelo linear proposto, além de apresentarem baixa dispersão.

Figura 13 - Curvas analíticas para o método mSBSE-HPLC-FD para FLU: (a) em matriz de “pool” de plasma (curva com pontos em vermelho; $n=9$) e (b) sem matriz (curva com pontos em preto; $n=9$).



Fonte: Próprio autor (2016).

Pela análise dos gráficos dos resíduos para as curvas analíticas em matriz e em ausência de matriz (respectivamente Figuras A3 e A4, ambas contidas no Apêndice A – Informação Suplementar), verificou-se a inexistência de tendências para os modelos lineares. É possível notar que a curva em matriz apresenta coeficiente linear consideravelmente maior que aquele da curva em ausência de matriz, o que já era esperado uma vez que a matriz plasmática interfere na análise. Entretanto, as retas para ambas as curvas são praticamente paralelas e, ainda, observa-se que a sensibilidade para a curva isenta de matriz foi ligeiramente maior que a curva em matriz, embora não tenha sido verificadas diferenças significativas em nível de 5% para as inclinações de ambas as curvas.

Tabela 4 -Parâmetros de validação para o método mSBSE-HPLC-FD para FLU em plasma humano ($n=9$).

Parâmetros de validação	Curva isenta de matriz	Curva em matriz plasmática
Faixa dinâmica de trabalho (ng mL^{-1})	25,00 a 250,00	25,00 a 250,00
Inclinação da curva analítica (ng mL^{-1})	790,29 ^a ±18,52	771,40 ^a ±37,06
Intercepto da curva (área de pico, u.a.)	39252,28±2562,21	69695,15±2520,50
Coeficiente de correlação, r	0,9902	0,9918
Coeficiente de determinação, r^2	0,9806	0,9838
Soma residual dos quadrados da regressão	1,33 x 10 ⁹	1,05 x 10 ⁹
Limite de detecção, LOD (ng mL^{-1})	9,73	9,80
Limite de quantificação, LOQ (ng mL^{-1})	32,42	32,67
Precisão intracorrida (CV%)	4,08	4,81
Precisão intermediária (CV%)	12,59	9,53
Exatidão (% de recuperação)	90,77	101,05

^aLetras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa em nível de 5% (teste de Tukey).

Ainda observando a Tabela 4, vê-se que os limites de detecção e quantificação para ambas curvas também foram semelhantes. É importante notar que o LOQ para as duas curvas foi superior ao primeiro ponto da curva de regressão linear (25,00 ng mL^{-1}). Deste modo, sugere-se que a quantificação seja realizado a partir do LOQ de cada curva, embora as mesmas não tenham tido falta de ajuste ao modelo linear, quando delineadas a partir de seis distintas concentrações do analito. A precisão intracorrida teve coeficientes de variação (CV) menores que 5%, indicando repetitividade, enquanto a precisão intermediária teve CVs menores que 15%, mostrando reprodutibilidade, considerando a complexidade da matriz do método bioanalítico desenvolvido. A exatidão do método mostrou-se adequada, considerando recuperações de 90 a 110% para métodos bioanalíticos. O método também foi seletivo e específico, não sendo verificada a existência de picos interferentes para o *pool* da matriz no tempo de retenção do analito e pelas taxas de recuperação que foram de 90,77% para o método aplicado isento de matriz e de 101,05% para os adicionados de padrão (Tabela 4), valores de acordo com a ANVISA. Não foi possível verificar a pureza do pico pelo FD, uma vez que o modelo RF-10AXL não se trata de um espectrofluorímetro, impossibilitando efetuar a varredura espectral.

O método cromatográfico mostrou-se robusto para variações de vazão de 0,85 ($t_R=8,0$ min) a 1,0 mL min^{-1} . Vazões menores que 0,80 e maiores que 1,05 mL min^{-1} proporcionam deslocamento dos tempos de retenção para 9,0 e 7,0

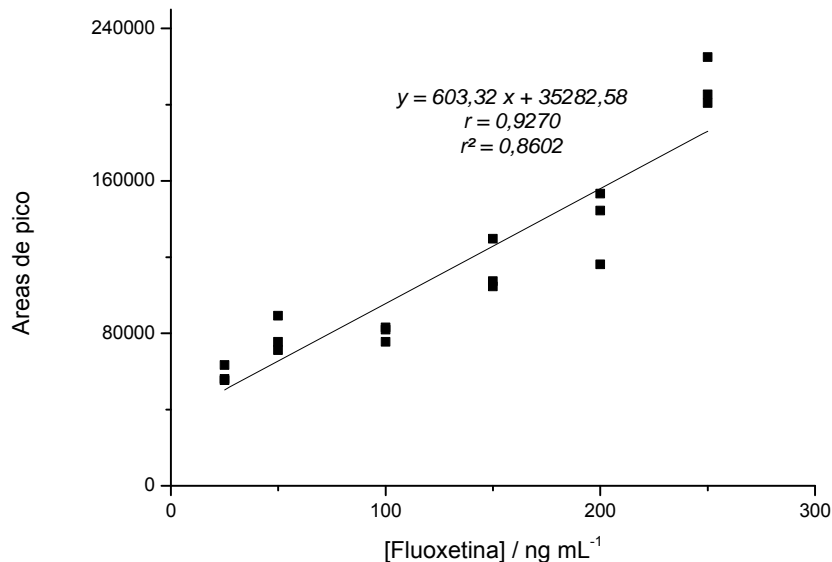
min, com diferença nas áreas de pico com coeficientes de variação (CV) maiores de 9,29 e 15,78%, respectivamente. O método mostrou-se robusto para temperatura da coluna de 40 °C e uso de tampão fosfato de sódio 50,0 mmol L⁻¹ em pH 4,07 em relação às condições de corrida descritas na subseção 2.6 “Condições cromatográficas”.

A curva analítica para a técnica LLE (Figura 14), utilizada para comparar a eficiência do método mSBSE, empregando um modelo linear (Equação 9) apresentou coeficiente de correlação linear com maior dispersão $r = 0,9275$ e menor coeficiente de determinação $r^2 = 0,8602$ e sensibilidade comparado a mSBSE.

$$y = 603,32 x + 35282,58 \quad (9)$$

em que y representa a área de pico e x a concentração de FLU (em ng mL⁻¹).

Figura 14 - Curva analítica para o método LLE-HPLC-FD para FLU em plasma humano ($n=9$).



Fonte: Próprio autor (2016).

Os limites de detecção e quantificação obtidos para LLE foram cerca de 6,5 vezes maiores que aqueles obtidos para a mSBSE. Não se avaliou a exatidão e precisão (intracorrída e intermediária) da LLE para a extração de FLU em plasma humano por se tratar de uma técnica já validada e bastante descrita na literatura. Embora a LLE tenha apresentado sensibilidade inferior se comparada a mSBSE

quando a detecção foi por fluorescência, deve considerar-se que esse método foi originalmente desenvolvido para ser empregado com LC-MS, visando avaliar a concentração no plasma de pacientes em tratamento com fluoxetina portadores de mal de Parkinson. Nesse método, após a etapa de extração, as amostras eram injetadas em sistema cromatográfico sendo a separação feita em coluna C8 (Lichropher® 100 RP-8, 250 x 4,6 mm; 5 µm), utilizando também pré-coluna C8, e a detecção realizada por espectrometria de massas, com ionização electrospray, no modo SIM e detector triplo-quadrupolo (DJORDJEVIC et al., 2005). Deste modo, os autores conseguiram validar o método e obtiveram LOQ de 2,5 ng mL⁻¹ para a FLU, já que a detecção por MS é mais sensível que a FD. Assim, se a mSBSE apresentou sensibilidade superior à LLE mesmo utilizando a FD, infere-se a possibilidade do método desenvolvido neste trabalho ser ainda mais sensível se realizado com a detecção por MS.

Considerando a maior sensibilidade da mSBSE em relação à LLE, menores LOD e LOQ, menores dispersões, bem como uma melhor limpeza (*clean-up*) das amostras (Figura 6), o método desenvolvido por mSBSE-HPLC-FD e validado será o adotado para as análises de FLU em plasma de pacientes em terapia, etapa a qual compõe o próximo passo desta pesquisa. Este estudo em última análise pretende viabilizar através do uso do método proposto uma nova perspectiva ao monitoramento terapêutico, objetivando um tratamento mais personalizado e ainda auxiliar em avaliações de bioequivalência, diante da resposta da FLU no organismo humano.

4 CONCLUSÃO

O método mSBSE-HPLC-FD desenvolvido pôde ser otimizado pelo planejamento experimental e por experimentos univariados para a extração nas etapas de sorção e dessorção de FLU em plasma humano. A validação do método mostrou que o mesmo é linear, preciso, exato e robusto, sendo os LOQ e LOD de 32,67 e 9,80 ng mL⁻¹, respectivamente.

O método de preparo de amostra por LLE, utilizado como referência para comparação, provou que o método proposto por mSBSE neste trabalho é mais sensível, linear e apresenta menor dispersão dos dados, além de promover um melhor *clean-up* para a matriz plasma preservando a coluna cromatográfica.

Portanto, este trabalho contribuiu com um método de extração mSBSE seguido de análise por HPLC-FD, que constitui uma ferramenta analítica adequada e útil para futuros estudos de monitoramento terapêutico para determinação das concentrações plasmáticas de pacientes em terapia com FLU, podendo proporcionar terapias personalizadas e mais eficientes aos pacientes.

REFERÊNCIAS

- BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; CRAMERS, C. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 11, p. 737-747, 1999.
- BAGHERI, H.; ZANDI, O.; AGHAKHANI, Z. Extraction of fluoxetine from aquatic and urine samples using sodium dodecyl sulfate-coated iron oxide magnetic nanoparticles followed by spectrofluorimetric determination. **Analytica Chimica Acta**, v. 692, p. 80-84, 2011.
- BARRETO, R. B.; VASCONCELOS, E. L.; ALBUQUERQUE, A. M. G. Grande reportagem: *Das pressões do existir, um mundo cada vez mais deprimido*. In: XXXVII Congresso de Ciências da Comunicação - XXI Prêmio Expocom, 2014. Foz do Iguaçu. Anais de XXXVII Congresso de Ciências da Comunicação. **Adaltech**, 2014.
- CHAVES, A. R.; SILVA, S. M.; QUEIROZ, R. H. C.; LANÇAS, F. M.; QUEIROZ, M. E. C. Stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with UV detection for determination of antidepressants in plasma samples. **Journal of Chromatography B**, v. 850, p. 295-302, 2007.
- CHAVES, A. R.; LEADRO, F. Z.; CARRIS, J. A.; QUEIROZ, M. E. C. Microextraction in packed sorbent for analysis of antidepressants in human plasma by liquid chromatography and spectrophotometric detection. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 2123-2129, 2010.
- COUTINHO, L. F. M. **Desenvolvimento de instrumentação dedicada a Cromatografia Líquida Capilar (cLC)**. Tese (Doutorado em Química – Química Analítica). Universidade de São Paulo. São Carlos, 05 de setembro de 2008.
- DAVID, F.; SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction for trace analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, p. 54-69, 2007.
- DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, p. 21-25, 1998.
- DJORDJEVIC, S.; KOVACEVIC, I.; MILIKOVIC, B.; VUKSANOVIC, J.; POKRAJAC, M. Liquid chromatographic-mass spectrometric method for the determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma: application to clinical study. **IL Farmaco** **60**, p. 345-349, 2005.
- FARIA, A. M.; BOTTOLI, C. B. G.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias monolíticas para separações cromatográficas. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 300-309, 2006.
- FEIJÓ, F. M.; BERTOLUCI, M. C.; REIS, C. Serotonina e controle hipotalâmico da fome: uma revisão. **Revista da Associação Médica Brasileira**, n. 57, v. 1, p. 74-77, 2011.

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.

GORENSTEIN, C.; SCAVONE, C. Avanços em psicofarmacologia - mecanismos de ação de psicofármacos hoje. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 1999, v. 21, n.1, p. 64-73, 1999.

HJERTÉN, S.; LIAO, J.; ZHANG, R. High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds. **Journal of Chromatography A**, v. 473, p. 273-275, 1989.

KRISTOFFERSEN, L.; BUGGE, A.; LUNDANES, E.; SLØRDAL, L. Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine, paroxetine and their metabolites in plasma and whole blood by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 734, p. 229-246, 1999.

LAMBERT, J. P.; MULLETT, W. M.; KWONG, E.; LUBDA, D. Stir bar sorptive extraction based on restricted access material for the direct extraction of caffeine and metabolites in biological fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 1075, p. 43-49, 2005.

LIANG, Y.; ZHANG, L.; ZHANG, Y. Recent advances in monolithic columns for protein and peptide separation by capillary liquid chromatography. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 2095-2106, 2013.

MARQUES, L. A. **Desenvolvimento e avaliação de barra sortiva para fluoxetina em plasma por HPLC**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química). Universidade Estadual de Londrina, 01 de novembro de 2013.

MELO, L. P.; NOGUEIRA, A. M.; LANÇAS, F. M.; QUEIROZ, M. E. C. Polydimethylsiloxane/polypyrrole stir bar sorptive extraction and liquid chromatography (SBSE/LC-UV) analysis of antidepressants in plasma samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 633, p. 57-64, 2009.

MOLANDER, P.; THOMASSEN, A.; KRISTOFFERSEN, L.; GREIBROKK, T.; LUNDANES, E. Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine, paroxetine and their metabolites in plasma by temperature-programmed packed capillary liquid chromatography with on-column focusing of large injection volumes. **Journal of Chromatography B**, v. 766, p. 77-87, 2001.

MONTEIRO, A. M. **Cromatografia líquida capilar: desenvolvimento de colunas empacotadas e monolíticas, celas de detecção UV e aplicação da programação de temperatura**. Tese (Doutorado em Química - Química Analítica). Universidade de São Paulo. São Carlos, 01 de outubro de 2010.

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

NENG, N. R.; PINTO, M. L.; PIRES, J.; MARCOS, P. M.; NOGUEIRA, J. M. F. Development, optimization and application of polyurethane foams as new polymeric phases for stir bar sorptive extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1171, p. 8-14, 2007.

NOGUEIRA, J. M. F. Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: a review on SBSE and related techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 757, p. 1-10, 2012.

Organização Mundial de Saúde (OMS). Mental health: *Depression*. Disponível em: <http://www.who.int/mental_health/management/depression/en/>, acessado em 11 de Outubro de 2015.

PIVETTA, M. Depressão por inflamação. **Revista Pesquisa FAPESP**, v. 219, p. 44-47, 2014.

PRADO, J. N.; PISSATTO, S.; MORAIS, E. C.; FOPPA, T.; MURAKAMI, F. S.; SILVA, M. A. S. Validação de Metodologia Analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para Doseamento de Cápsulas de Fluoxetina. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 3, n. 25, p. 436-440, 2006.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p. 68-74, 2001.

RAGGI, M. A.; MANDRIOLI, R.; CASAMENTI, G.; BUGAMELLI, F.; VOLTERRA, V. Determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma by high-pressure liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 18, p. 193-199, 1998.

ROT, M. aan het.; MATHEW, S. J.; CHARNEY, D. S. Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. **CMAJ**, n. 3, v. 180, p. 305-313, 2009.

SABBIONI, C.; BUGAMELLI, F.; VARANI, G.; MERCOLINI, L.; MUSENGA, A.; SARACINO, M. A.; FANALI, S.; RAGGI, M. A. A rapid HPLC-DAD method for the analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma from overdose patients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 36, p. 351-356, 2004.

SILVA, B. J. G.; LANÇAS, F. M.; QUEIROZ, M. E. C. Determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by polypyrrole-coated capillary in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, n. 1216, p. 8590-8597, 2009.

SILVA, C. R.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; AIROLDI, C. Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 270-276, 2004.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8 ed. São Paulo: Thomson, 2006. p.1026.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. p. 863

TENG, C. T.; HUMES, E. C.; DEMETRIO, F. N. Depressão e comorbidades clínicas. **Revista de Psiquiatria Clínica**, São Paulo, v. 3, n. 32, p. 149 –159, 2005.

UNCETA, N.; BARRONDO, S.; AZÚA, I. R.; GÓMEZ-CABALLERO, A.; GOICOLEA, M. A.; SALLÉS, J.; BARRIO, R. J. Determination of fluoxetine, norfluoxetine and their enantiomers in rat plasma and brain samples by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, n. 852, p. 519-528, 2007.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.

VISMARI, L.; ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Depressão, antidepressivos e sistema imune: um novo olhar sobre um velho problema. **Revista Brasileira de Psiquiatria Clínica**, v. 5, n. 35, p. 196-204, 2008.

VON MÜHLEN, C.; LANÇAS, F. M. Cromatografia unificada. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 747-753, 2004.

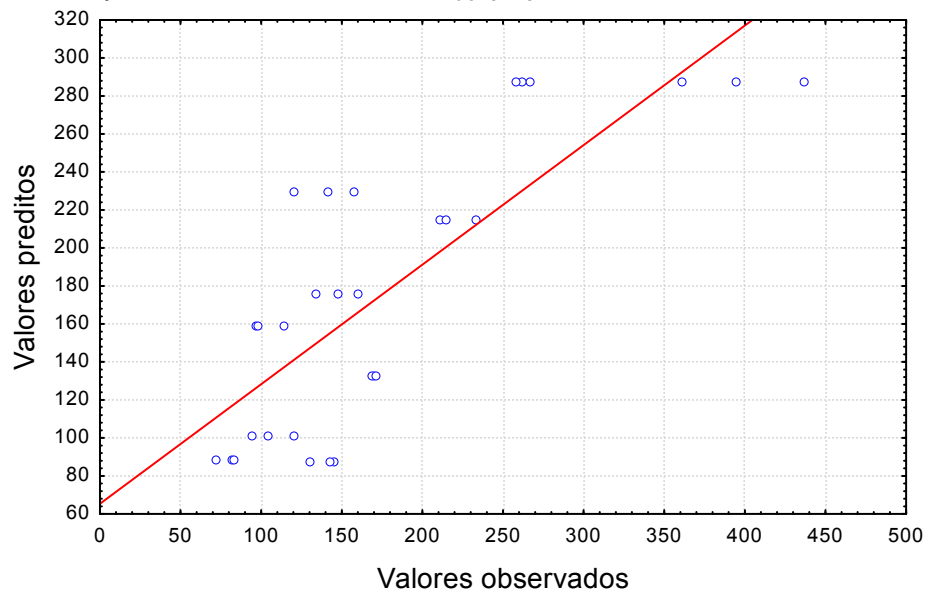
APÊNDICES

APÊNDICE A
Informação Suplementar

Tabela A1 - Delineamento composto central com duas variáveis codificadas (x_1 e x_2) e respectiva função resposta (Y) na etapa de sorção da extração empregando mSBSE de FLU 250 ng mL⁻¹ em plasma humano.

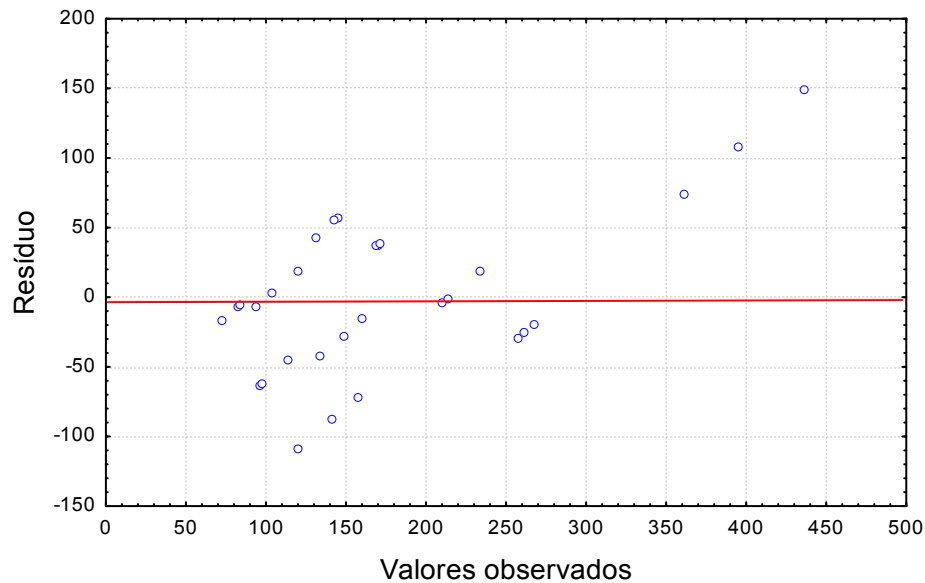
Ensaio	Variáveis codificadas		Função resposta (Y)		
	x_1 (Temperatura)	x_2 (Tempo)	[Fluoxetina]/ng mL ⁻¹		
1	- 1,0	1,0	145,30	142,70	130,77
2	1,0	- 1,0	83,60	72,70	82,50
3	1,0	1,0	169,30	171,30	169,60
4	- 1,0	- 1,0	93,80	103,60	120,10
5	0,0	0,0	261,30	257,50	267,20
6	0,0	0,0	360,80	394,80	436,20
7	- 1,0	0,0	96,20	113,80	97,40
8	1,0	0,0	160,20	148,20	133,40
9	0,0	- 1,0	210,40	233,40	214,10
10	0,0	1,0	120,57	157,00	141,80

Figura A1 - Resultados experimentais em função dos resultados preditos pelo modelo polinomial para a otimização da sorção por mSBSE de FLU em plasma humano.



Fonte: Próprio autor (2016).

Figura A2. Resíduos dos resultados experimentais obtidos no delineamento composto central da etapa de sorção empregando mSBSE de FLU em plasma humano.



Fonte: Próprio autor (2016).

Tabela A2 - Concentração de FLU (ng mL^{-1}) mensurada em função dos diferentes níveis de velocidade de agitação magnética empregados na etapa sorção de extração a partir da concentração plasmática de 250 ng mL^{-1} .

Ensaio	Níveis de velocidades de extração		
	Mínima	Média	Máxima
1	157,19	298,46	161,91
2	150,98	310,78	173,65
3	159,32	247,78	166,11
4	146,84	246,41	173,57
5	162,66	268,45	171,10
Média	155,40 ^b	274,38 ^a	169,27 ^b
CV%	4,12	10,67	3,03

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa em nível de 5% (teste de Tukey).

Tabela A3 - Concentração de FLU (ng mL^{-1}) em função do tempo de dessorção na etapa da extração a partir da concentração plasmática de 250 ng mL^{-1} .

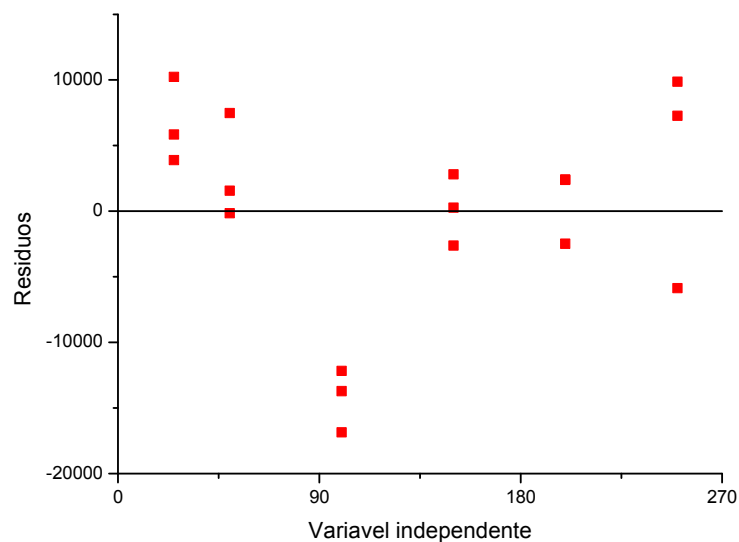
Ensaio	Tempo de dessorção (min)							
	15	20	25	30	35	40	45	50
1	89,22	89,03	89,28	96,97	161,82	268,45	199,07	260,72
2	92,66	104,37	72,09	98,63	192,06	247,78	204,57	219,16
3	88,88	90,15	90,60	92,62	161,09	246,41	249,82	200,59
4	87,79	95,16	97,07	95,31	170,18	190,87	271,87	217,97
5	88,35	89,94	90,74	106,34	168,29	214,47	250,88	227,84
Média	89,38	93,73	87,96	97,97	170,69	233,60	235,24	225,26
CV%	2,14	6,84	10,65	5,28	7,37	13,15	13,52	9,83

Tabela A4 - Concentração de FLU (ng mL^{-1}) em função dos modos de dessorção da extração a partir da concentração plasmática de 250 ng mL^{-1} .

Ensaio	[Fluoxetina]/ ng mL^{-1} Modos de dessorção	
	Ultrassonicação*	Agitação Magnética**
1	157,85	247,78
2	174,98	246,41
3	175,68	268,45
4	196,96	300,34
5	177,34	298,46
Média	176,56 ^b	272,29 ^a
CV%	7,86	9,64

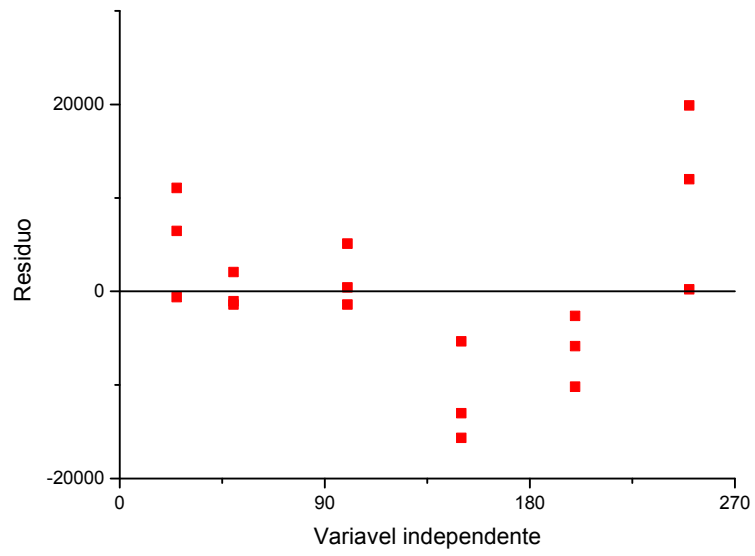
Frequência de ultrassonicação 37 kHz; ** Agitação magnética em velocidade média; ^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa em nível de 5% (teste de Tukey).

Figura A3 - Resíduos dos dados utilizados para construção da curva analítica em matriz empregando mSBSE de FLU em plasma humano.



Fonte: Próprio autor (2016).

Figura A4 - Resíduos dos dados utilizados para construção da curva analítica em ausência de matriz empregando mSBSE de FLU em plasma humano.



Fonte: Próprio autor (2016).