



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**Desenvolvimento das barras imunosorventes de
agitação e avaliação das técnicas extração sortiva em
barra de agitação, microextração em sorvente
empacotado e cromatografia líquida para análise de
antidepressivos em amostras de plasma**

FERNANDA ZAMPIERI LEANDRO

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras da Universidade
de São Paulo, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutor em Ciências,
Área: **Química**.

RIBEIRÃO PRETO-SP

2010



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**Desenvolvimento das barras imunosorventes de agitação e
avaliação das técnicas extração sortiva em barra de
agitação, microextração em sorvente empacotado e
cromatografia líquida para análise de antidepressivos em
amostras de plasma**

FERNANDA ZAMPIERI LEANDRO

Orientadora: Maria Eugênia Queiroz Nassur

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras da Universidade
de São Paulo, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutor em Ciências,
Área: **Química**.

RIBEIRÃO PRETO-SP

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Leandro, Fernanda Zampieri

Desenvolvimento das barras imunosorventes de agitação e avaliação das técnicas extração sortiva em barra de agitação, microextração em sorvente empacotado e cromatografia líquida para análise de antidepressivos em amostras de plasma.

191 p.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientadora: Nassur, Maria Eugênia Queiroz.

1. Extração sortiva em barra de agitação. 2. Imunosorvente. 3. Microextração em sorvente empacotado. 4. Antidepressivos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernanda Zampieri Leandro

Desenvolvimento das barras imunosorventes de agitação e avaliação das técnicas extração sortiva em barra de agitação, microextração em sorvente empacotado e cromatografia líquida para análise de antidepressivos em amostras de plasma

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: **Química**.

Aprovada em: 15/12/2010

Banca Examinadora

Prof. Dr.	<u>Isabel Cristina Sales Fontes Jardim</u>	Assinatura	<u>[assinatura]</u>
Instituição	<u>Instituto de Química/Unicamp</u>		
Prof. Dr.	<u>FERNANDO MAURO LANGST</u>	Assinatura	<u>[assinatura]</u>
Instituição	<u>USP - INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS</u>		
Prof. Dr.	<u>EDUARDO BRANDT DE OLIVEIRA</u>	Assinatura	<u>E. B. Oliveira</u>
Instituição	<u>USP - FACULDADE DE MEDICINA R. P.</u>		
Prof. Dr.	<u>PIETRO CIANCAGLI MI</u>	Assinatura	<u>[assinatura]</u>
Instituição	<u>FFCLRP - USP</u>		
Prof. Dr.	<u>MARIA EUGÊNIA BUEIROS NASSUN</u>	Assinatura	<u>[assinatura]</u>
Instituição	<u>FFCLRP - USP</u>		

Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus pais, Izilda e
Leandro, e à minha irmã, Estela. Agradeço
a vocês pelo respeito, compreensão, incentivo,
paciência, companheirismo e espiritualidade...
fundamentais para a realização de mais esta
jornada em minha vida!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder a vida... companheiro inseparável...de todos os momentos...!!!

À espiritualidade amiga, pelo amparo constante e imprescindível;

Aos meus pais, Izilda e Leandro, pelo amor, carinho e dedicação;

À minha irmã Estela, pelo apoio incondicional;

À prof^a. Maria Eugênia Queiroz, pela oportunidade de realizar este trabalho e pela grande contribuição científica para o meu amadurecimento acadêmico;

Ao prof. Eduardo Brandt de Oliveira, por me receber tão bem em seu laboratório, por me contagiar com seu jeito intrínseco de fazer ciência e pela imensa colaboração neste trabalho, o que me permitiu agregar conhecimentos de outras áreas. Muito obrigada!

À minha segunda mãe e amiga, Marta... que apesar de não estar mais entre nós, deixou-me exemplo de simplicidade e humildade que guardarei por toda a vida.

“De tudo, ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto, devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...”

“O Encontro Marcado” - Fernando Sabino (1956).

Aos meus familiares Aline, Corina, Bruna, Zezé, Melisa e Camila. Sou muito grata a vocês!

Aos amigos Gislene, Antônio Clóvis, Débora Castro, Marquinho e Andreza, por me acompanharem em mais uma etapa da minha vida, sempre me apoiando, incentivando;

Às amigas Valéria, Bruna Scaranto, Viviane Martins, Ana Maria e Tílinha, companheiras de tantos momentos...;

Aos companheiros de laboratório do Departamento de Química: Juciene, Bruno José, Andréa, Fernandinha, Lidervan, Luana, Miriam, Mateus, Natássia e Jordana;

Aos amigos e colaboradores de laboratório: Felipe, Hugo, Lara e Odete (Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina-USP/RP);

Aos colaboradores do laboratório de Cromatografia do IQ/USP- São Carlos: Alessandra, Carlos Eduardo e Elaine;

Às secretárias do programa de pós-graduação: Lâmia (Química); Fabiana, Denise e Inês (Filô);

À prof^a. Regina H. Queiroz por ceder as amostras de plasma de pacientes em terapia com os antidepressivos;

Ao prof. Fernando M. Lanças por ter me dado a oportunidade de realizar uma parte do projeto em seu laboratório;

A todos que, nas mais diferentes circunstâncias, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos...!!!

Ao CNPq, CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro concedido.

“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim; esquenta e esfria, aperta e depois afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre e amar, no meio da tristeza. Todo caminho da gente é resvaloso, mas cair não prejudica demais. A gente levanta, a gente sobe, a gente volta.”

(João Guimarães Rosa em “Grande Sertão Veredas”, 1956).

RESUMO

LEANDRO, F.Z. **Desenvolvimento das barras imunosorventes de agitação e avaliação das técnicas extração sortiva em barra de agitação, microextração em sorvente empacotado e cromatografia líquida para análise de antidepressivos em amostras de plasma.** 2010. 191 p. Tese (Doutorado)-Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Neste trabalho, os anticorpos policlonais e monoclonais anti-fluoxetina foram produzidos em coelhos e camundongos, respectivamente, por imunização com o conjugado fluoxetina-soroalbumina bovina. Os anticorpos obtidos foram caracterizados em função da especificidade contra o fármaco por ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) e posteriormente, purificados por afinidade em coluna fluoxetina-agarose *labmade*. Os anticorpos purificados foram imobilizados covalentemente na superfície vítrea das barras SBSE (extração sortiva em barra de agitação) *labmade*. Após a derivatização das barras com 3-aminopropiltrietoxisilano, dois métodos distintos de acoplamento dos anticorpos às barras SBSE foram avaliados: ativação com glutaraldeído e succinilação seguida de ativação via éster *N*-hidroxisuccinimida (NHS). A funcionalização das barras SBSE foi comprovada através da imobilização de enzima peroxidase (HRP) em lugar do anticorpo e posterior ensaio enzimático com as barras. Várias barras SBSE com diferentes áreas (1,2; 2,4; e 4,0 cm²) foram preparadas, dentre as quais, as com maior área imunosorvente apresentaram maiores taxas de recuperação do fármaco. A avaliação da morfologia da superfície da barra SBSE imunosorvente foi realizada através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As variáveis do processo SBSE de imunoafinidade foram otimizadas para estabelecer o equilíbrio de sorção antígeno-anticorpo em um menor tempo de análise e obtenção de limite de quantificação compatível com o intervalo terapêutico do fármaco. As capacidades adsorptivas

das barras imunosorventes foram de 1,2 e 8 μg por cm^2 para anticorpos policlonais e monoclonais, respectivamente. Os imunosorventes desenvolvidos apresentaram reatividade-cruzada apenas com norfluoxetina (metabólito ativo de fluoxetina). As barras imunosorventes foram reutilizadas aproximadamente 30 vezes, sem perda significativa da eficiência das extrações. Baseados nos parâmetros de validação analítica avaliados, os métodos de SBSE/LC-FD de imunoafinidade desenvolvidos são adequados para a determinação de fluoxetina em amostras de plasma de pacientes em terapia com o fármaco, para fins de monitorização terapêutica. Por conseguinte, esses métodos foram aplicados com êxito para análises de amostras de plasma de pacientes idosos em terapia com Prozac[®].

Neste trabalho, o método MEPS (microextração em sorvente empacotado)/LC-UV também foi desenvolvido e validado para análise simultânea de sertralina, paroxetina, citalopram, fluoxetina e mirtazapina em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica. As variáveis do processo MEPS foram otimizadas (pH e volume da amostra, força iônica, volume dos ciclos aspirar-dispensar e condições de dessorção) para estabelecer o equilíbrio de sorção em menor tempo de análise e obter sensibilidade analítica adequada para a determinação dos antidepressivos no intervalo terapêutico. O método MEPS/LC-UV desenvolvido permitiu integração da dessorção dos analitos e injeção da amostra no sistema cromatográfico (LC-UV) em uma única etapa, usando a microsseringa de extração MEPS. A fase extratora MEPS, M1 (C8/SCX), foi reutilizada mais de 50 vezes com perda mínima da eficiência da extração, comprovando a robustez do material sorvente. Segundo os parâmetros de validação analítica avaliados, o método MEPS/LC-UV desenvolvido é adequado para a determinação de antidepressivos em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica.

Palavras-chave: Extração sortiva em barra de agitação. Imunosorvente. Microextração em sorvente empacotado. Cromatografia líquida. Antidepressivos. Amostras de plasma.

ABSTRACT

LEANDRO, F.Z. **Development of immunosorbent stir bars and evaluation of stir bar sorptive extraction, microextraction by packed sorbent and liquid chromatography techniques for the analysis of antidepressants in plasma samples.** 2010. 191 p. Tese (Doutorado)-Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

In this work, polyclonal and monoclonal anti-fluoxetine antibodies were developed in rabbits and mice by immunization with fluoxetine-bovine albumin conjugate, respectively. The developed antibodies were characterized on the basis of the specificity against the drug by ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) and, subsequently they were purified by labmade fluoxetine-agarose affinity column. The purified antibodies were covalently immobilized onto the glass surface of labmade SBSE (stir bar sorptive extraction) bars. After derivatization of the bars with 3-aminopropyltriethoxysilane, two distinct methods were evaluated for the antibodies coupling to the SBSE bars: activation with glutaraldehyde and succinylation activation via ester *N*-hydroxysuccinimide (NHS). The functionalization of SBSE bars was confirmed by the immobilization of peroxidase (HRP) instead of the antibody and, subsequent enzymatic assay with the bars. Several SBSE bars with different areas (1.2, 2.4, and 4.0 cm²) were prepared, among of them the largest immunosorbent area showed higher recovery rates of the drug. The evaluation of surface morphology of the SBSE immunosorbent bar was performed using scanning electron microscopy (SEM). The SBSE immunoaffinity variables were optimized to establish sorption equilibrium of antigen-antibody in a short time analysis and to obtain the limit of quantification compatible with the therapeutic range of the drug. The adsorptive capacities of the immunosorbent bars were 1.2 and 8 µg per cm² for polyclonal and monoclonal antibodies, respectively. The developed

immunosorbents showed cross-reactivity only with norfluoxetine (active metabolite of fluoxetine). The immunosorbent bars were reused approximately 30 times without significant loss of the extraction efficiency. Based on evaluated analytical validation parameters, the developed immunoaffinity SBSE/LC-FD methods are suitable for the determination of fluoxetine in plasma samples from patients on therapy with the antidepressant for therapeutic drug monitoring. Therefore, these methods were successfully applied for the analysis of plasma samples from elderly patients undergoing therapy with Prozac[®].

In this work, the method MEPS (microextraction by packed sorbent)/ LC-UV was also developed and validated for the simultaneous analysis of sertraline, paroxetine, citalopram, fluoxetine and mirtazapine in plasma samples for therapeutic drug monitoring. The MEPS process variables were optimized (pH, sample volume, ionic strength, draw-eject cycles volume and desorption conditions) to establish the sorption equilibrium in a short time analysis and to obtain adequate analytical sensitivity for determination of antidepressants within therapeutic range. The developed MEPS/LC-UV method allowed integration of the analytes desorption and sample injection in the chromatographic system (LC-UV) in a single step, using a MEPS extraction microsyringe. The MEPS extraction phase, M1 (C8/SCX) was reused over 50 times with minimum loss of extraction efficiency, proving the robustness of the sorbent material. According to the evaluated analytical validation parameters, the developed MEPS/LC-UV method is suitable for the determination of antidepressants in plasma samples for therapeutic drug monitoring.

Keywords: Stir bar sorptive extraction. Immunosorbent. Microextraction by packed sorbent. Liquid Chromatography. Antidepressants. Plasma Samples.

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1.1 Estruturas químicas: (a) fluoxetina e (b) norfluoxetina.....	39
Figura 1.2 Estrutura química do citalopram.....	40
Figura 1.3 Estrutura química da sertralina.....	41
Figura 1.4 Estrutura química da paroxetina.....	42
Figura 1.5 Estrutura química da mirtazapina.....	44

Capítulo 2

Figura 2.1 Representação esquemática da barra de agitação SBSE.....	60
Figura 2.2 Processo SBSE: (A) extração no modo direto e (B) extração por <i>headspace</i> . Extraído de [5].....	63
Figura 2.3 Sistema de dessorção térmica SBSE. Adaptado de [6].....	65
Figura 2.4 Processo SBSE: dessorção líquida em banho de ultrassom (com ou sem controle de temperatura).....	65
Figura 2.5 Esquema do processo de derivatização no capilar, durante a dessorção térmica. Adaptado de [7].....	66
Figura 2.6 Estrutura básica de uma imunoglobulina do tipo G. F _{ab} : fragmento que contém o sítio de ligação do antígeno, determinante do anticorpo: a parte aminoterminal deste fragmento realiza o reconhecimento e permite o acoplamento com o antígeno. F _c : fração constante da cadeia pesada, cuja função específica é a regulação da imunoresposta frente ao hospedeiro [70].....	72
Figura 2.7 Imunoglobulina imobilizada no suporte e reconhecimento pelo antígeno. As setas indicam os sítios disponíveis de ligação do antígeno. Adaptado de [91].....	80

Figura 2.8 Etapas da extração dos analitos através da SPE de imunoafinidade. Adaptado de [92].	83
Figura 2.9 Foto da placa de ELISA, sem tratamento prévio, utilizada na detecção dos anticorpos anti-fluoxetina. Poços individuais são identificados pelas coordenadas das linhas A-H e colunas 1-5	95
Figura 2.10 Esquema da purificação dos anticorpos anti-fluoxetina através das colunas de afinidade <i>labmade</i> . (A) Adição da solução de soro previamente purificado por precipitação por sulfato de amônio; (B) ligação dos anticorpos específicos à fluoxetina; (C) lavagem dos anticorpos não-específicos e (D) eluição dos anticorpos específicos anti-fluoxetina.	99
Figura 2.11 Barras SBSE (imunosorvente) representativas para cada área (1,2; 2,4 e 4,0 cm ²).	101
Figura 2.12 Espectro de fluorescência de uma solução padrão de fluoxetina (1µg mL ⁻¹). ...	108
Figura 2.13 Espectro de fluorescência de uma solução padrão de fluoxetina (1µg mL ⁻¹), plotado no programa de computador (Origin 8.0).	109
Figura 2.14 Foto da placa de ELISA revestida com OVA-fluoxetina: resultados positivos confirmando a especificidade bem como a atividade dos anticorpos anti-fluoxetina frente ao antígeno (colunas 1, 3 e 5) e resultados negativos, ausência de especificidade (colunas 2 e 4).	110
Figura 2.15 <i>Dot</i> em membrana de nitrocelulose com 5 µL de cada fração eluída das diferentes sepharoses: (A) Seph-BSA-fluoxetina e (B) Seph-εAC-fluoxetina.	111
Figura 2.16 Avaliação da eficiência das colunas imunoabsorventes através da análise SPE de imunoafinidade/LC-FD de amostras de plasma branco enriquecidas com solução padrão de fluoxetina (50 ng mL ⁻¹): (A) coluna imunoabsorvente com anticorpos purificados pela Seph-BSA-fluoxetina e (B) coluna imunoabsorvente com anticorpos purificados Seph-εAC-fluoxetina.	112

Figura 2. 17 Titulação do líquido ascítico dos clones anti-fluoxetina (ELISA): (A) clone B1; (B) clone E7 e (C) clone F5.....	113
Figura 2.18 Reações envolvidas na imobilização dos anticorpos anti-fluoxetina na superfície da barra SBSE: (a) silanização da superfície SBSE com 3-APTES; (b) ativação da superfície SBSE com glutaraldeído e (c) imobilização dos anticorpos.....	114
Figura 2.19 Imagens da microscopia eletrônica de varredura de: (a) superfície da barra SBSE sem tratamento prévio; (b) superfície SBSE silanizada; (c) superfície SBSE ativada com glutaraldeído e (d) superfície SBSE revestida com anticorpos anti-fluoxetina.....	115
Figura 2.20 Funcionalização das barras SBSE: (A) superfície funcionalizada com 3-APTES e (B) superfície funcionalizada com 3-APTES e glutaraldeído.	116
Figura 2.21 Análises SBSE imunosorvente/LC-FD de amostras de plasma branco enriquecidas com solução padrão de fluoxetina na concentração de 100 ng mL ⁻¹ . Foram avaliados glutaraldeído e NHS como agentes de imobilização dos anticorpos anti-fluoxetina, na superfície da barra SBSE, previamente funcionalizada com 3-APTES.	117
Figura 2.22 Análises SBSE imunosorvente/LC-FD de amostras de plasma branco de referência enriquecidas com solução padrão de fluoxetina na concentração de 100 ng mL ⁻¹ , utilizando barras SBSE de diferentes dimensões (1,2; 2,4 e 4,0 cm ²).....	118
Figura 2. 23 Otimização das variáveis do processo SBSE de imunoafinidade: (a) extração e (b) dessorção.	120
Figura 2.24 Avaliação das capacidades adsorptivas das barras SBSE imunosorventes através das análises SBSE/LC-FD de amostras de plasma branco enriquecidas com solução padrão de fluoxetina em diferentes concentrações: (A) anticorpos policlonais e (B) anticorpos monoclonais.....	121

Figura 2.25 Cromatogramas representativos do método SBSE/LC-FD de imunoafinidade: (a) amostra de plasma branco de referência e (b) amostra de plasma branco enriquecido com solução padrão de fluoxetina na concentração de 10 ng mL ⁻¹ (LOQ).....	125
Figura 2.26 Cromatograma representativo de uma das amostras de plasma de pacientes idosos em terapia com Prozac [®] . A concentração de fluoxetina determinada foi de 94 ng mL ⁻¹	127

Capítulo 3

Figura 3.1 Microseringa MEPS (250 µL) e microcoluna com material sorvente empacotado. O volume morto é de aproximadamente 7 µL. Adaptado de [1]......	147
Figura 3.2 Ilustração das etapas do processo MEPS. Adaptado de [4]......	149
Figura 3.3 Efeito do volume de amostra de plasma (enriquecida com solução padrão dos fármacos na concentração de 500 ng mL ⁻¹) diluída com solução tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ (pH 4,0; 1:1; v/v) na eficiência do MEPS/LC. A análise foi realizada em triplicata (<i>n</i> =3)...	162
Figura 3.4 Otimização das variáveis MEPS: (A) efeito do pH das amostras de plasma diluídas com diferentes soluções tampão (fosfato e borato- pH 4,0; 5,5; 7,0 e 9,0) na eficiência do método; (B) efeito do volume da amostra aspirar-dispensar na eficiência do método; (C) efeito dos ciclos aspirar-dispensar na eficiência do método e (D) influência da força iônica na eficiência do método MEPS/LC-UV. Todos os ensaios foram realizados com 400 µL de amostra de plasma (enriquecida com solução padrão dos analitos na concentração de 500 ng mL ⁻¹) diluída com 400 µL de solução tampão e dessorção líquida dos fármacos com 150 µL de fase móvel (<i>n</i> =3)......	165
Figura 3.5 Efeito do solvente de dessorção na eficiência do processo MEPS. As análises MEPS/LC-UV foram realizadas com 400 µL de amostra de plasma (enriquecida com os analitos na concentração de 500 ng mL ⁻¹) diluída com 400 µL de solução tampão fosfato	

50 mmol L⁻¹ (pH 4,0) e 3 ciclos aspirar-dispensar (3x250 µL) e dessorção líquida dos analitos com 150 µL de solvente (fase móvel, água, metanol e solução tampão fosfato pH 4,0) (n=3).

..... 166

Figura 3.6 Influência dos compostos endógenos na seletividade do método MEPS/LC.

Amostras enriquecidas com os antidepressivos (200 ng mL⁻¹) analisadas por MEPS/LC-UV.

(A) amostra de água; (B) amostra de plasma após precipitação com solução saturada de sulfato de amônio; (C) amostra de plasma diluída com solução tampão fosfato 50 mmol L⁻¹

pH 4,0 1:1 (v/v) e (D) amostra de plasma humano centrifugada. PI: padrão interno moclobemida (500 ng mL⁻¹); **1:** Citalopram; **2:** Mirtazapina; **3:** Fluoxetina; **4:** Paroxetina e **5:**

Sertralina..... 169

Figura 3.7 Cromatogramas MEPS/LC-UV de: (A) amostra de plasma humano branco de

referência e (B) amostra de plasma humano branco de referência enriquecida com solução padrão dos antidepressivos (200 ng mL⁻¹). PI: padrão interno moclobemida (500 ng mL⁻¹); **1:**

Citalopram; **2:** Mirtazapina; **3:** Fluoxetina; **4:** Paroxetina e **5:** Sertralina..... 170

Figura 3.8 Análise MEPS/LC-UV de amostra de plasma de paciente idoso em terapia com

Paxil[®]. A concentração de paroxetina determinada foi de 38 ng mL⁻¹. 175

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1.1 Classificação dos transtornos de humor de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico da Associação Norte-Americana de Psiquiatria-IV. Adaptado de [10].	30
--	----

Capítulo 2

Tabela 2.1 Aplicações da técnica SBSE (barra comercial) para análise de diferentes compostos em fluidos biológicos.	67
Tabela 2.2 Aplicações da técnica SBSE com barras <i>labmade</i> para análise de fármacos em fluidos biológicos.	70
Tabela 2.3 Aplicações de imunosorventes para a análise de uma ampla variedade de analitos em fluidos biológicos.	84
Tabela 2.4 Precisão interensaio (CV) e exatidão dos métodos SBSE/LC-FD ($n=5$).	123

Capítulo 3

Tabela 3.1 Comparações de parâmetros entre as técnicas MEPS, SPE e SPME [4].	146
Tabela 3.2 Aplicações da técnica MEPS para análise de fármacos e metabólitos em amostras biológicas.	150
Tabela 3.3 Linearidade e limite de quantificação (LOQ) do método MEPS/LC-UV para análise de antidepressivos em amostras de plasma.	171
Tabela 3.4 Precisão interensaio (CV) e exatidão do método MEPS/LC-UV para análise de antidepressivos em amostras de plasma.	172

Tabela 3.5 Exatidão e precisão (CV) do método MEPS/LC utilizando três diferentes microcolunas M1, para análises das amostras de plasma humano branco de referência enriquecidas com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL ⁻¹	173
Tabela 3.6 Tempo de retenção dos fármacos analisados pelo método MEPS/LC-UV como possíveis interferentes.....	173
Tabela 3.7 Precisão interensaio (CV), limite de quantificação (LOQ) e tempo de extração para as análises MEPS/LC, SPME/LC [23] e SBSE/LC [24] de antidepressivos (500 ng mL ⁻¹) em amostras de plasma	174

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs anticorpos

ACN acetonitrila

ADS alquil-diol-sílica

ADTs antidepressivos tricíclicos

Ag antígeno

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BSA soroalbumina bovina

CDI carbodiimidazol

CE eletroforese capilar

CV coeficiente de variação

C8 octil

C18 octadecil

DAD detector de arranjo de diodo

EDAC 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

ELISA enzyme immunosorbent assay (ensaio imunoenzimático)

F_{ab} fragmento do sítio de ligação do antígeno ao anticorpo

F_c fração constante da cadeia pesada

FD detector de fluorescência

FLX fluoxetina

GC cromatografia gasosa

HRP enzima peroxidase

HS *headspace*

IgG imunoglobulina do tipo G

IMAOs inibidores da monoamino oxidase

ISRSs inibidores seletivos da recaptação de serotonina

LC cromatografia líquida

LD dessorção líquida

LLE extração líquido-líquido

LOD limite de detecção

LOQ limite de quantificação

MeOH metanol

MEPS microextração em sorvente empacotado

MES ácido 2-*N*-morfolinoetanosulfônico

MEV microscopia eletrônica por varredura

MIPS polímeros molecularmente impressos

MS espectrômetro de massa

NaSSa receptores noradrenérgico e serotoninérgico

NHS *N*-hidroxisuccinimida

OMS Organização Mundial de Saúde

OPD ortofenilendiamino

OVA ovalbumina

PBS tampão fosfato salino

PDMS polidimetilsiloxano

PPY polipirrol

RAM material de acesso restrito

SBSE extração sortiva em barra de agitação

SCX trocador forte de cátion

Seph Sepharose

SPE extração em fase sólida

SPME microextração em fase sólida

TBS tampão tris-HCl-salina

TD dessorção térmica

TRIS tris-(hidroximetil)-aminometano

UV ultravioleta

VIS visível

εAC ácido ε-aminocapróico

3-APTES 3-aminopropiltriétoxisilano

5-HT 5-hidroxitriptamina (serotonina)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	27
<i>Conceitos e tratamento farmacológico da depressão e métodos analíticos para análise de antidepressivos em fluidos biológicos</i>	27
1 INTRODUÇÃO	28
1.1 Depressão	29
1.1.1 História	29
1.1.2 Classificação: tipos de depressão	30
1.1.3 Dados estatísticos	31
1.1.4 Depressão em idosos	32
1.2 Tratamento farmacológico da depressão	34
1.2.1 Inibidores seletivos da recaptação de serotonina	35
1.2.1.1 Fluoxetina	38
1.2.1.2 Citalopram	39
1.2.1.3 Sertralina	41
1.2.1.4 Paroxetina	42
1.2.2 Antidepressivos Atípicos: Receptores Noradrenérgico e Serotonérgico	43
1.2.2.1 Mirtazapina	43
1.3 Monitorização Terapêutica ^[63-66]	44
1.4 Métodos Analíticos	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
CAPÍTULO 2	58
<i>Desenvolvimento de barras de agitação para extração sortiva com anticorpos monoclonais e policlonais anti-fluoxetina como fase imunosorvente, em conjunto ao sistema cromatográfico LC-FD para análise de fluoxetina em amostras de plasma</i>	58
1 INTRODUÇÃO	59
1.1 Extração sortiva em barra de agitação	60
1.1.1 Fundamentos Teóricos	60
1.1.2 Processo SBSE e aplicações	63
1.1.3 Fases SBSE seletivas	69
1.2 Fases extratoras de imunoafinidade	71
1.2.1 Anticorpos e Antígenos ^[70-76]	71
1.2.1.1 Interação antígeno-anticorpo ^[77]	73
1.2.2 Imunosorvente ^[78,79]	74
1.2.2.1 Produção dos anticorpos ^[69,76]	75
1.2.2.2 Imunoensaios ^[80-82]	76
1.2.2.3 Suportes de imunoafinidade ^[83-86]	77

1.2.2.4 Métodos de imobilização do anticorpo ^[87-91]	78
1.2.2.5 Etapas do processo de imunoextração ^[92]	82
2 OBJETIVOS	87
3 MATERIAIS E MÉTODOS	89
3.1 Reagentes, padrões primários e equipamentos	90
3.2 Amostras de plasma branco de referência	92
3.3 Amostras de plasmas de pacientes	92
3.4 Preparo do imunógeno e imunização dos coelhos.....	93
3.5 Detecção e atividade dos anticorpos anti-fluoxetina.....	93
3.6 Purificação do imunosoro	95
3.6.1 Precipitação com sulfato de amônio	95
3.6.2 Desenvolvimento das colunas de afinidade <i>labmade</i>	96
3.6.2.1 Desenvolvimento da Sepharose-εAC-FLX.....	97
3.6.2.2 Desenvolvimento da Sepharose-BSA-FLX	97
3.6.3 Purificação dos anticorpos anti-fluoxetina através de coluna de afinidade <i>labmade</i>	98
3.6.4 Avaliação da eficiência da coluna de afinidade <i>labmade</i> e especificidade dos anticorpos purificados ...	99
3.7 Condições cromatográficas.....	100
3.8 Desenvolvimento das barras SBSE imunosorvente	100
3.9 Imobilização dos anticorpos anti-fluoxetina na superfície das barras SBSE	101
3.10 Microscopia Eletrônica de Varredura	102
3.11 Avaliação da superfície da barra SBSE funcionalizada.....	102
3.12 Otimização do processo de SBSE com a fase imunosorvente	103
3.13 Validação Analítica	104
3.13.1 Linearidade	104
3.13.2 Precisão interensaio	104
3.13.3 Exatidão	105
3.13.4 Limite de Quantificação.....	106
3.13.5 Seletividade e Especificidade	106
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
4.1 Análise de fluoxetina no espectrofluorímetro 3-D	108
4.2 Preparo do imunógeno e imunização dos coelhos.....	109

4.3 Detecção e atividade dos anticorpos anti-fluoxetina.....	109
4.4 Purificação e dosagem dos anticorpos específicos anti-fluoxetina.....	110
4.5 Titulação do líquido ascítico dos clones anti-fluoxetina	112
4.6 Desenvolvimento da barra SBSE imunosorvente	114
4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	115
4.8 Avaliação da superfície da barra funcionalizada.....	116
4.9 Avaliação de diferentes reagentes no processo de imobilização	117
4.10 Avaliação da área superficial da barra SBSE imunosorvente.....	118
4.11 Otimização das variáveis do processo SBSE de imunoafinidade	118
4.12 Avaliação das capacidades adsorptivas das barras SBSE imunosorventes desenvolvidas.....	120
4.13 Validação Analítica	122
4.13.1 Linearidade	122
4.13.2 Limite de Quantificação.....	122
4.13.3 Precisão interensaio e exatidão	123
4.13.4 Reprodutibilidade das barras SBSE com a fase imunosorvente	124
4.13.5 Estabilidade e robustez das barras SBSE com a fase imunosorvente	124
4.13.6 Seletividade e especificidade dos métodos de imunoafinidade SBSE/LC-FD	124
4.14 Aplicação do método SBSE/LC-FD de imunoafinidade para fins de monitorização terapêutica	126
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130
<i>CAPÍTULO 3.....</i>	<i>144</i>
<i>Microextração em sorvente empacotado em conjunto ao sistema cromatográfico LC-UV para análise de antidepressivos em amostras de plasma</i>	<i>144</i>
1 INTRODUÇÃO	145
1.1 Microextração em sorvente empacotado.....	146
1.1.1 Fundamentos Teóricos ^[1-4]	146
1.1.2 Processo MEPS para análise de fluidos biológicos ^[1-4]	147
1.1.3 Aplicações de MEPS para amostras biológicas	150
2 OBJETIVOS.....	154

3 MATERIAIS E MÉTODOS	156
3.1 Reagentes, padrões primários e equipamentos	157
3.2 Amostras de plasma branco de referência	158
3.3 Amostras de plasmas de pacientes	158
3.4 Condições cromatográficas.....	158
3.5 Preparo das amostras de plasma.....	159
3.6 Procedimento MEPS	159
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	161
4.1 Preparo das amostras de plasma.....	162
4.2 Procedimento MEPS	163
4.3 Efeito da matriz no procedimento MEPS e métodos para reduzir ruído da linha-base.....	167
4.4 Validação Analítica	170
4.5 Aplicação clínica do método MEPS/LC-UV desenvolvido.....	175
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	176
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	178

Capítulo 1

*Conceitos e tratamento farmacológico da
depressão e métodos analíticos para análise
de antidepressivos em fluidos biológicos*

1 INTRODUÇÃO

1.1 Depressão

1.1.1 História

Os transtornos de humor são conhecidos desde épocas remotas. Há aproximadamente 25 séculos estes foram descritos e denominados *melancolia*, que é o termo mais antigo para a patologia dos transtornos de humor [1,2]. Este termo surgiu da teoria da *bile negra*- derivado do grego *melas* (negro) e *kholé* (bile), e que corresponde à transliteração latina *melaina-kole* [3,4].

Hipócrates (460-377 AC), considerado o pai da medicina, descreveu a melancolia como “aversão à comida, desespero, falta de sono, irritabilidade e inquietação”, acreditando que as doenças deveriam emergir do temperamento melancólico. O filósofo considerava duas formas de melancolia: a endógena, aquela que aparece sem motivo aparente; e a exógena, que surge como resultado de um trauma externo [5]. Após o século XVII, os conceitos de melancolia, bem como as discussões psiquiátricas modificaram-se completamente.

Em meados do século XVIII, Pinel introduziu o termo melancolia ou delírio, considerando-o uma insanidade parcial. Com o desenvolvimento científico, no século XIX, houve uma preferência pelo termo “depressão” em detrimento do termo “melancolia”, vindo do francês a partir do latim – *de premere*– que significa pressionar para baixo [6].

No final do século XIX, Emil Kraepelin agrupa definitivamente a depressão e a mania em uma única entidade nosológica (loucura maníaco-depressiva), como uma forma de insanidade caracterizada como endógena, devido a fatores biológicos internos. Embora não conseguisse comprovação anátomo-patológica, considerou ainda que a insanidade maníaco-depressiva seria diferente das depressões clínicas, que teriam uma causalidade psicogênica, não interna; configurando-se a dicotomia endógeno-exógeno, que durante muito tempo foi de plena aceitação [7,8].

1.1.2 Classificação: tipos de depressão

A depressão pode se apresentar em numerosos quadros clínicos, psíquicos e físicos, ou em decorrência de situações socioculturais, econômicas e financeiras desfavoráveis e/ou insatisfatórias.

Como síndrome, apresenta-se com sintomas como tristeza imotivada e contínua (humor depressivo), acentuada redução ou perda do prazer em coisas/situações antes satisfatórias ou agradáveis (anedonia), além de outros, tais como choro e culpa imotivados, fadiga, perda de energia, isolamento, manifestações relacionadas às alterações da cognição, psicomotricidade, sono e apetite.

Na condição de entidade clínica, a depressão é classificada, de acordo com o CID-10 (Classificação Internacional de Doenças-10) [9] e DSM-IV (Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais- Quarta Edição) [10]. O Manual Diagnóstico e Estatístico da Associação Norte-Americana de Psiquiatria-IV, compreende a nomenclatura oficial e oferece critérios diagnósticos específicos para os transtornos mentais (**Tabela 1.1**). Os transtornos de humor constituem uma categoria que abrange sinais e sintomas clinicamente reconhecíveis, persistentes e geralmente com padrão recorrente ou cíclico.

Tabela 1.1 Classificação dos transtornos de humor de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico da Associação Norte-Americana de Psiquiatria-IV. Adaptado de [10].

<i>Categoria</i>	<i>Subtipos principais</i>	<i>Características</i>
Transtornos depressivos	Transtorno depressivo maior	Predomínio de humor
	Transtorno distímico	deprimido e anedonia,
	Transtorno depressivo sem outra especificação	contudo, sem histórico de episódios maníacos, mistos ou hipomaníacos.

Continua **Tabela 1.1...**

...Continuação da **Tabela 1.1.**

<i>Categoria</i>	<i>Subtipos principais</i>	<i>Características</i>
Transtornos bipolares	Transtorno bipolar I	Crises depressivas
	Transtorno bipolar II	acompanhadas de episódios
	Transtorno ciclotímico	maníacos, mistos ou
	Transtorno bipolar sem outra especificação	hipomaníacos.
Outros	Transtorno de humor devido a uma condição clínica geral	Perturbação de humor como consequência fisiológica de uma condição clínica geral.
	Transtorno de humor induzido por substância	Perturbação de humor como consequência fisiológica de uso de droga.

1.1.3 Dados estatísticos

Nos últimos anos, a depressão tornou-se prioridade para a saúde pública, devido à sua alta prevalência e consequências como morbidade, mortalidade, custos sociais e econômicos [11]. O gasto total com o tratamento da depressão foi de aproximadamente US\$ 83,1 bilhões nos Estados Unidos em 2000 [12] e US\$ 118 bilhões na Europa em 2004 [13].

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), em todo o mundo, cerca de 340 milhões de pessoas apresentam depressão, a qual tem sido considerada, o mais comum dos distúrbios afetivos [14]. Desse total, aproximadamente 10 milhões são brasileiros. Embora, esta síndrome possa afetar indivíduos em qualquer fase da vida, alguns estudos indicam que os sintomas são altamente prevalentes em idosos, tanto no Brasil como no mundo

[15]. Além disso, a depressão em suas diversas manifestações clínicas apresenta incidência de 2 a 3 vezes maior nas mulheres [16,17].

A depressão pode levar a casos extremos, como o suicídio, estando associada à morte de cerca de 850.000 pessoas por ano. Os índices de suicídio são cerca de vinte vezes maiores em pacientes deprimidos quando comparados à população geral [18].

De acordo com os dados divulgados pela OMS em setembro de 2009, nos próximos 20 anos, a depressão deve se tornar a doença mais comum no mundo, afetando mais pessoas do que qualquer outro problema de saúde, incluindo câncer e doenças cardíacas [19].

1.1.4 Depressão em idosos

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde, entre 1950 e 2025, a população brasileira de idosos crescerá 16 vezes, enquanto que a população total crescerá cinco vezes. Desta forma, estima-se que para o ano de 2025, o Brasil terá a sexta maior população mundial de idosos, cerca de 32 milhões de pessoas pertencerão a esse grupo etário [20].

O aumento da população idosa enferma está associado à prevalência elevada de doenças crônico-degenerativas, dentre elas, aquelas que comprometem o funcionamento do sistema nervoso central, como as enfermidades neuropsiquiátricas, particularmente a depressão.

No idoso, a depressão tem sido caracterizada como uma síndrome que envolve inúmeros aspectos clínicos, etiopatogênicos e de tratamento. Esta síndrome, frequentemente, associa-se a doenças clínicas gerais e a anormalidades estruturais e funcionais do cérebro. Caso não tratada, a depressão aumenta o risco de morbidade clínica e de mortalidade, principalmente em idosos hospitalizados com enfermidades gerais.

As causas de depressão no idoso configuram-se dentro de um conjunto amplo de componentes onde atuam fatores genéticos; episódios vitais, como luto e abandono; doenças incapacitantes; entre outros. Cabe ressaltar ainda que, a depressão no idoso, na maior parte dos casos, surge em um contexto de perda da qualidade de vida associada ao isolamento social e ao surgimento de doenças clínicas graves.

As enfermidades crônicas e incapacitantes constituem fatores de risco para depressão. Os sentimentos de frustração perante os anseios de vida não realizados; a própria história da pessoa marcada por perdas progressivas - do companheiro, dos laços afetivos e da capacidade de trabalho -; bem como o abandono; o isolamento social; a incapacidade de reengajamento na atividade produtiva; a ausência de retorno social do investimento escolar; ou ainda uma aposentadoria que mina os recursos mínimos de sobrevivência; são fatores que comprometem a qualidade de vida e predisõem o idoso ao desenvolvimento de depressão [21].

Quando os sintomas da depressão colocam em risco a condição clínica do paciente e o sofrimento psíquico é significativo, faz-se necessária a intervenção psicofarmacológica, cuja finalidade é diminuir o risco de suicídio, melhorar o estado geral do paciente e garantir uma qualidade de vida melhor.

O tratamento da depressão, como também o de outras doenças neuropsiquiátricas no idoso, constitui um desafio que envolve intervenção especializada. Entre as estratégias de tratamento para os transtornos depressivos destacam-se a psicoterapia, a intervenção psicofarmacológica e, quando necessário, a eletroconvulsoterapia [22].

O tratamento psicofarmacológico da depressão no idoso depende, essencialmente, do perfil de tolerabilidade do paciente em relação aos antidepressivos [22]. Estima-se que 90% dos suicídios em idosos estão associados a algum tipo de doença mental e que, a mais frequente, seja a depressão [23].

1.2 Tratamento farmacológico da depressão

A descoberta dos antidepressivos no final da década de 50 e a utilização dos mesmos na prática clínica trouxeram um avanço relevante no tratamento e na compreensão de possíveis mecanismos subjacentes aos transtornos depressivos. Esta descoberta possibilitou que a depressão fosse um problema clínico passível de tratamento, semelhante a outras doenças, como o diabetes e a hipertensão arterial. Atualmente, há pelo menos 35 antidepressivos diferentes disponíveis no mundo todo; entretanto, a disponibilidade dos mesmos varia consideravelmente nos mercados dos países [24].

As classificações dos antidepressivos usados na prática clínica baseiam-se, principalmente, em fatores históricos, bem como em propriedades estruturais e farmacológicas; porém, infelizmente, não seguem sempre uma abordagem sistemática.

Tradicionalmente, os antidepressivos foram agrupados nas seguintes categorias principais: antidepressivos tricíclicos (ADTs); antidepressivos tetracíclicos; inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs); inibidores da monoaminoxidase (IMAOs) (incluindo os IMAOs irreversíveis e os inibidores reversíveis da monoaminoxidase A [IRMA]); e os antidepressivos atípicos, como os inibidores da recaptação de serotonina-noradrenalina [IRSNs] e os antidepressivos noradrenérgicos-serotonérgicos específicos (NaSSa) [25-27].

Os inibidores da monoaminoxidase e os antidepressivos tricíclicos dominaram o tratamento da depressão durante quase trinta anos, até o final da década de 1980 [28]. Embora eficazes e ainda muito utilizados, estes antidepressivos apresentam efeitos adversos relativamente intensos, causados pela não especificidade de sua ação farmacológica e, em casos de superdosagem têm sido potencialmente letais [29].

As observações iniciais de que os antidepressivos bloqueiam a recaptação neuronal ou inibem o metabolismo de norepinefrina ou serotonina (5-HT) levaram à hipótese clássica de

que a depressão decorreria da falta desses neurotransmissores no sistema nervoso central [30-32]. O restabelecimento das funções neuronais envolvidas na regulação do humor ocorreria, portanto, através da ligação destes neurotransmissores aos seus receptores, desencadeando uma cascata de sinais intracelulares que ativam fatores de transcrição, os quais promoveriam a expressão de genes [33].

O papel da serotonina na origem dos estados depressivos foi postulado há cerca de 40 anos. Desde essa época, inúmeros estudos clínicos com animais e pacientes deprimidos, estudos com depleção de serotonina e estudos *post-mortem* têm dado suporte a essa hipótese [34].

A serotonina compõe o grupo das aminas biogênicas (neurotransmissores). Os níveis cerebrais de serotonina estão relacionados às alterações de comportamento e humor, tais como ansiedade, agressividade, depressão, sono, fadiga, supressão de apetite, etc. Os mecanismos bioquímicos precisos, pelos quais, os neurônios serotoninérgicos controlam estas funções ainda não estão totalmente esclarecidos.

1.2.1 Inibidores seletivos da recaptação de serotonina

Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina constituem um grupo de antidepressivos, no qual se incluem, atualmente, os fármacos mais prescritos em todo o mundo. Deste grupo fazem parte: fluoxetina, sertralina, paroxetina, fluvoxamina, citalopram e escitalopram. Após a introdução da fluvoxamina, em 1983, a fluoxetina tornou-se o ISRS mais amplamente utilizado seguido por paroxetina, citalopram e sertralina [34].

Os ISRSs pertencem a diferentes famílias químicas, contudo, os mesmos têm em comum a capacidade de inibir seletivamente a recaptação de serotonina, ação mais importante do que outras, tais como a recaptação de noradrenalina e a atuação em receptores, como os adrenérgicos (alfa-1), os colinérgicos (muscarínicos) ou os histamínicos [35-39]. Esses

fármacos elevam a concentração de serotonina, predominantemente na área somatodendrítica dos neurônios serotoninérgicos por bloqueio específico da recaptação. Esses processos são responsáveis pelo aparecimento dos efeitos terapêuticos e adversos desses medicamentos [39].

Os ISRSs apresentam maior segurança terapêutica, redução de interações medicamentosas e efeitos adversos mais brandos em relação aos tricíclicos, principalmente, quanto à cardiotoxicidade e aos efeitos anticolinérgicos (boca seca, constipação, visão turva, retenção urinária, toxicidade cognitiva), e ainda, são menos sedativos [36-38;40].

Embora compartilhem o mesmo mecanismo de ação, os ISRSs são estruturalmente distintos, com diferenças nos perfis farmacodinâmico e farmacocinético, os quais incluem os parâmetros: meia-vida, volume de distribuição, absorção, biodisponibilidade, farmacocinética linear versus não linear, depuração, metabolização e o potencial de inibir as enzimas do citocromo P450 (CYP), principal responsável pela metabolização dos medicamentos.

Os ISRSs são rapidamente absorvidos, ligam-se fortemente às proteínas plasmáticas (alta porcentagem: fluvoxamina e menor porcentagem: citalopram) e deslocam outros fármacos da ligação protéica, aumentando o nível plasmático. Metabolizados primariamente pelo fígado, os ISRSs afetam as enzimas metabolizadoras (maior importância na prática clínica psiquiátrica: enzimas CYP2D6 e CYP2C19) do citocromo P450 (em menor proporção sertralina) e podem comprometer o metabolismo de outras drogas metabolizadas por este sistema [41].

As concentrações plasmáticas de sertralina e citalopram são proporcionais às doses administradas (farmacocinética linear), o que não ocorre com a fluoxetina, paroxetina e fluvoxamina cuja farmacocinética não é linear. Estes inibidores seletivos da recaptação da serotonina diminuem o metabolismo por ação inibitória dose-dependente das isoenzimas do citocromo P450, o que significa que, um aumento da dose administrada de fluoxetina,

paroxetina e fluvoxamina leva a um aumento desproporcional nos níveis plasmáticos, meia-vida e, possivelmente, efeitos adversos [41,42].

A fluoxetina e a paroxetina são os inibidores mais potentes da CYP2D6, seguidas por fluvoxamina, sertralina e citalopram. A fluoxetina merece uma atenção especial pelo fato de que sua atividade inibitória da CYP2D6 pode persistir por várias semanas após sua descontinuação, devido à meia-vida longa e ao metabólito norfluoxetina [35].

Estas diferenças farmacocinéticas sustentam as distintas aplicações clínicas cada vez mais importantes dos ISRSs para os transtornos depressivos [41].

Quanto ao perfil farmacodinâmico, os ISRSs se diferem pela potência, expressa como constante de inibição (K_i) em nM a receptores específicos, podendo ter fármacos mais seletivos em relação ao transportador de serotonina e outros menos seletivos, que apresentam complexos efeitos secundários, tais como maior afinidade a receptores transportador de noradrenalina. A variabilidade farmacodinâmica interindividual responde por grande parte da variação total da resposta entre os pacientes [43,44].

A potência da inibição da recaptação de serotonina é variada, assim como a seletividade por noradrenalina e dopamina. A sertralina e a paroxetina são os mais potentes inibidores de recaptação [41]. A potência relativa da sertralina em inibir a recaptação de dopamina a diferencia farmacologicamente dos demais ISRSs. A paroxetina, além de agir centralmente, também inibe a síntese de óxido nítrico [45]. Já o citalopram e a fluoxetina são misturas racêmicas de diferentes formas quirais, fazendo com que estes, apresentem perfil farmacodinâmico e farmacocinético variados. A afinidade por neuroreceptores, tais como histamínico, colinérgico muscarínico e adrenérgico, também difere muito entre os ISRSs.

Os efeitos adversos menos intensos e frequentes dos ISRSs (agitação, alteração do sono, disfunção sexual e distúrbios gastrintestinais) devem-se à baixa afinidade por receptores colinérgicos, noradrenérgicos e histamínicos. Além disso, os ISRSs apresentam taxas mais

baixas de descontinuação do tratamento de modo geral [24]. Desta forma, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina têm constituído a primeira escolha para o tratamento da depressão em idosos [46].

1.2.1.1 Fluoxetina

A fluoxetina (**Figura 1.1a**) é um antidepressivo para administração oral, bicíclico derivado de fenilpropilamina. Este fármaco é extensivamente metabolizado no fígado e eliminado, principalmente, pela urina, sendo menos de 10% na forma inalterada ou conjugada com o ácido glucurônico.

O produto de biotransformação, proveniente da *N*-desmetilação de maior relevância é a norfluoxetina (**Figura 1.1b**), a qual apresenta atividade clínica significativa (inibição da recaptação de serotonina e inibição de isoenzimas do citocromo P-450, CYP2D6). Este metabólito é o ISRS eliminado mais lentamente do organismo. Outros produtos de biotransformação da fluoxetina correspondem a 73% da eliminação do fármaco na urina [41,47,48].

Após a administração da fluoxetina, no mínimo 80% da dose é absorvida. As concentrações máximas no plasma ocorrem após a ingestão do fármaco, num período de aproximadamente 6 a 8 horas. A depuração da fluoxetina é de $9,6 \pm 6,9$ mL/min/kg, a qual é reduzida com doses repetidas a aproximadamente 2,6 mL/min/kg.

Cerca de 94% de fluoxetina ligam-se às proteínas séricas, incluindo a albumina e a α 1-glicoproteína. O volume de distribuição da fluoxetina é de 26-35 L/kg e a meia-vida é de 2 a 4 dias e a da norfluoxetina, de 6 a 9 dias. A meia-vida prolongada da fluoxetina e da norfluoxetina e o tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio apresentam efeito clínico significativo, como maior latência para o início da ação antidepressiva. A faixa de

concentração plasmática terapêutica recomendada para este fármaco tem sido de 30-500ng mL⁻¹ [49,50].

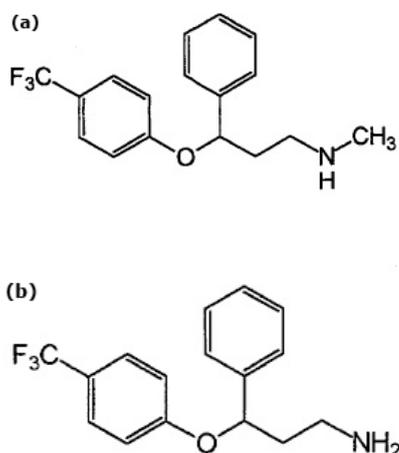


Figura 1.1 Estruturas químicas: **(a)** fluoxetina e **(b)** norfluoxetina.

O fármaco fluoxetina (nomes comerciais: Prozac[®], Daforin[®], Deprax[®], Eufor[®], Nortec[®], dentre outros) foi o primeiro antidepressivo comercializado da classe dos ISRSs. Em 1996, foi o medicamento mais vendido nos Estados Unidos.

Em relação ao emprego terapêutico, a fluoxetina apresenta eficácia clínica no tratamento de depressão, doença compulsivo-obsessiva, bulimia nervosa, obesidade e doença disfórica pré-menstrual, doença do pânico e distímia. Os efeitos adversos mais relatados incluem dores de cabeça, alterações do sono, do apetite e disfunção sexual [47,48].

1.2.1.2 Citalopram

O citalopram (nomes comerciais: Cittá[®]; Cipramil[®]; Procimax[®], Cipran[®], dentre outros) [Figura 1.2] é rapidamente absorvido após a dose oral, alcançando a concentração plasmática máxima em aproximadamente 3 horas (1-6 horas). A absorção deste fármaco não é afetada pela ingestão de alimentos. A biodisponibilidade é de 80% (52 a 90%), com uma absorção quase completa e metabolismo de primeira passagem limitado. O volume de

distribuição é de 12-16 L/kg e a ligação deste antidepressivo e dos seus metabólitos às proteínas plasmáticas é em torno de 50-80 %.

O tratamento com dose diária, oral e única, fornece concentrações plasmáticas de equilíbrio estáveis. O estado de equilíbrio é atingido em 1 a 2 semanas e está relacionado linearmente à dose administrada. Não ocorre acúmulo do fármaco, mesmo durante o tratamento em longo prazo. A meia-vida do citalopram é de aproximadamente 35 horas, permitindo, portanto a administração em dose única.

Os metabólitos do citalopram incluem desmetilcitalopram, didesmetilcitalopram, citalopram-*N*-óxido (ativos) e um derivado desaminado do ácido propiônico (inativo). O metabólito desmetil tem meia-vida de 49 horas e o didesmetil, de 102 horas. Os níveis plasmáticos e a atividade farmacológica desses metabólitos são menores quando comparados com os níveis do citalopram. É o único ISRS avaliado para tratamento intravenoso.

Em pacientes idosos, a meia-vida é mais longa e os níveis de depuração são mais baixos, indicando uma atividade metabólica menor, o que implica no ajuste da dose administrada. Os efeitos adversos são brandos e pouco frequentes, tais como: náuseas, sonolência, aumento da sudorese e tremores [24,40,51,52]. As concentrações plasmáticas terapêuticas recomendadas têm sido de 30 a 300 ng mL⁻¹ [49,50]. Estes efeitos tendem a diminuir em frequência e intensidade após poucas semanas do início do tratamento.

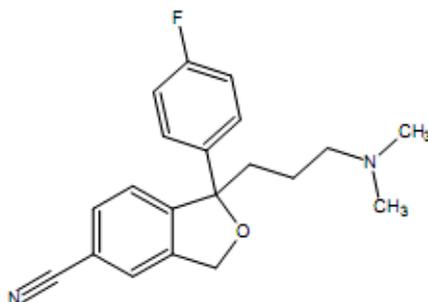


Figura 1.2 Estrutura química do citalopram.

1.2.1.3 Sertralina

A sertralina (nomes comerciais: Zoloft[®], Assert[®], Novativ[®], Sertalin[®], dentre outros) [Figura 1.3] é lentamente absorvida após a administração oral e a taxa de absorção não é afetada pela dose. Entretanto, a administração concomitante com alimento acarreta no aumento da concentração plasmática, portanto, o fármaco deve ser administrado junto às refeições para assegurar níveis ótimos de absorção. Cerca de 98% do fármaco circulante se unem às proteínas plasmáticas. O pico plasmático se dá em torno de 7 horas após a administração e sua concentração é proporcional à dose. A meia-vida da sertralina é de 26 horas e como permanece constante, permite a administração em dose única. O estado de equilíbrio plasmático é alcançado em 7 dias.

Após a absorção, a sertralina é intensamente metabolizada pelo fígado, originando o metabólito primário desmetilsertralina, um composto clinicamente inativo. Posteriormente, essa amina é metabolizada a α -hidroxi-cetona. Os metabólitos conjugados são excretados pela urina ou bile. Segundo a literatura, a farmacocinética da sertralina não tem sido alterada com a idade do paciente. Os efeitos adversos mais relatados são: náuseas (21,2%), cefaléia (18%), diarreia (15,2%) e insônia (14,5%) [24,51,53]. A faixa de concentração terapêutica recomendada tem sido da ordem de 25-300 ng mL⁻¹ [49,50].

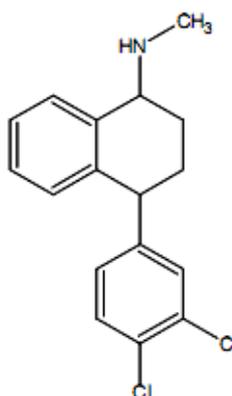


Figura 1.3 Estrutura química da sertralina.

1.2.1.4 Paroxetina

A paroxetina (nomes comerciais: Aropax[®], Arotin[®], Parox[®], Paxil[®], dentre outros) é um derivado fenilpiperidínico (**Figura 1.4**). Após a administração oral, é completamente absorvida e metabolizada rapidamente para dar origem a metabólitos cinquenta vezes menos potentes, que em sua maior parte são polares (predominam glicurônidos e sulfatos), os quais são eliminados rapidamente. Um dos passos na biotransformação depende de uma enzima facilmente saturável, o que dá como resultado uma falta de linearidade na farmacocinética do fármaco.

A distribuição pelo organismo é rápida, incluindo o sistema nervoso central, e fica um remanescente de 1% no plasma. A meia-vida da paroxetina é de 24 horas e o volume de distribuição é de 13 L/kg. Este fármaco liga-se fortemente às proteínas plasmáticas (cerca de 95%). As afecções renais e hepáticas provocam um incremento nas concentrações plasmáticas da paroxetina, tanto que em idosos atingem concentrações 7 a 80% superiores às concentrações nos indivíduos mais jovens [24,40]. As concentrações plasmáticas terapêuticas recomendadas têm sido de 30 a 500 ng mL⁻¹ [49,50].

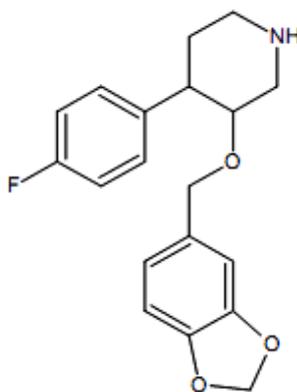


Figura 1.4 Estrutura química da paroxetina.

1.2.2 Antidepressivos Atípicos: Receptores Noradrenérgico e Serotonérgico

Após o desenvolvimento dos ISRSs, outras classes de fármacos têm surgido para o tratamento da depressão, como por exemplo, os receptores noradrenérgico e serotonérgico (NaSSa) que não se caracterizam nem como tricíclicos ou ISRSs e nem como inibidores da monoaminooxidase.

Esses fármacos compartilham a propriedade de bloqueio inibitório pré-sináptico dos α_2 -adrenoceptores, resultando em um aumento do sinal sináptico, liberando desta forma, serotonina e noradrenalina. Os mesmos também agem em vários receptores pós-sinápticos, inclusive o neurotransmissor monoamino serotonina. Os antidepressivos dessa classe tendem a ter efeito calmante [25]. Dentro dessa classe, destaca-se o fármaco mirtazapina, como um dos mais prescritos na clínica.

1.2.2.1 Mirtazapina

A mirtazapina (**Figura 1.5**) é um antidepressivo noradrenérgico e serotonérgico seletivo (NaSSA), o qual atua no aumento da liberação sináptica da serotonina e noradrenalina. Este fármaco atua no bloqueio dos inibidores pré-sinápticos α_2 -adrenérgicos e dos receptores pós-sinápticos serotoninérgicos tipo 2 e tipo 3 [54-56]. Este fármaco pertence a uma série química de compostos conhecidos como piperazinoazepinas, a qual não é relacionada com nenhuma outra classe conhecida de fármacos psicotrópicos [57,58].

A mirtazapina é um fármaco de caráter básico e lipofílico que, quando administrada via oral, é rapidamente absorvida; apresenta biodisponibilidade de 50% e a concentração plasmática máxima é alcançada em 2 horas. A meia-vida de eliminação da mirtazapina é de 20-40 horas e, cerca de 85% do fármaco se ligam às proteínas plasmáticas [59]. O

antidepressivo mirtazapina é extensivamente metabolizado, em grande parte através de vias oxidativas, envolvendo o sistema enzimático citocromo P450 [60].

A mirtazapina é parcialmente metabolizada a 8-hidroximirtazapina (aproximadamente 40%). Essa reação é catalisada principalmente pela isoenzima CYP2D6 e em menor extensão pela CYP1A2. A mirtazapina sofre também *N*-desmetilação (aproximadamente 25%) e *N*-oxidação (aproximadamente 10%), catalisadas pela CYP3A4, resultando na formação de desmetilmirtazapina e *N*-óxido-mirtazapina (aproximadamente 25%) [55,59]. A faixa de concentração plasmática terapêutica recomendada tem sido de 5 a 100 ng mL⁻¹ [61,62].

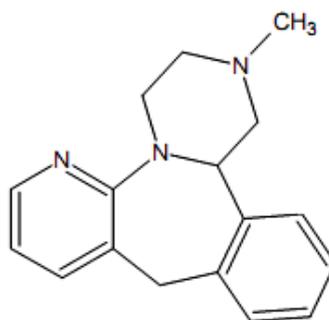


Figura 1.5 Estrutura química da mirtazapina.

1.3 Monitorização Terapêutica ^[63-66]

A eficácia da terapia com fármacos no tratamento de distúrbios do sistema nervoso central em humanos tem como base a farmacologia clínica, que estabelece o medicamento adequado, doses e periodicidade da administração.

A intensidade dos efeitos terapêuticos ou tóxicos dos fármacos está relacionada à concentração no sítio de ação do órgão ou sistema suscetível ao efeito benéfico requerido e a variação nas características de cada paciente.

O intervalo terapêutico, ou faixa de concentração de um fármaco em fluido biológico (plasma ou soro) corresponde às concentrações plasmáticas que geram efeito mínimo, mas

eficaz (limite mínimo), as quais resultam em efeito tóxico (concentração máxima tolerada, limite máximo). Os fármacos com amplo intervalo terapêutico apresentam ampla faixa de concentração plasmática que resulta no efeito terapêutico requerido. Já as concentrações plasmáticas em níveis tóxicos excedem às concentrações terapêuticas.

Infelizmente, muitos fármacos apresentam pequeno intervalo terapêutico (I.T. < 10), por apresentarem uma pequena diferença entre as concentrações terapêuticas e tóxicas. Nesses casos, torna-se imprescindível criteriosa monitorização/correlação da dose administrada com os efeitos clínicos e concentrações plasmáticas destes fármacos, visando assegurar eficácia clínica com brandos efeitos adversos.

A monitorização terapêutica tem sido descrita como valioso recurso clínico, na individualização do regime de dosagem, de acordo com a concentração do fármaco e/ou de seus produtos de biotransformação, em amostras de plasma ou soro, coletadas com base no contexto clínico e nos princípios da farmacocinética.

O objetivo da monitorização terapêutica é assegurar a eficácia e minimizar os efeitos adversos dos fármacos prescritos na clínica. Os fármacos monitorados têm sido aqueles que apresentam intervalos terapêuticos bem estabelecidos. A maioria dos pacientes que apresentam concentrações plasmáticas dentro deste intervalo fixo tem os transtornos psiquiátricos mantidos sob controle e efeitos adversos aceitáveis.

A aplicação clínica da monitorização terapêutica tem sido indicada em situações nas quais a eficácia do medicamento é questionada; quando o paciente apresenta sinais de toxicidade relacionados ao fármaco; quando há suspeita de não aderência do paciente ao regime de dosagem estabelecido; nas situações de interações medicamentosas; nas patologias associadas capazes de alterar a distribuição do fármaco; em casos de mudanças na formulação; ou ainda quando a condição do paciente é refratária ao regime de dosagem convencional.

Os poucos estudos clínicos existentes quanto ao tratamento da depressão em idosos relatam que os antidepressivos têm sido prescritos no intervalo terapêutico; porém, esses indivíduos têm apresentado alta descontinuidade no tratamento, devido aos efeitos adversos que essas dosagens podem acarretar. Dessa forma, o risco de recorrência é alto para esses indivíduos.

Os pacientes idosos acometidos por doenças psiquiátricas, em geral, fazem uso diversos outros medicamentos, sendo submetidos à polifarmacoterapia, torna-se, então, de grande relevância, a monitorização terapêutica dos níveis plasmáticos desses pacientes, de forma a propiciar um maior controle dos sintomas por eles apresentados, visando diminuir os efeitos adversos e obter maior eficácia no tratamento farmacológico, garantindo sua continuidade.

O desenvolvimento de métodos analíticos rápidos, sensíveis e seletivos tem sido requerido para a determinação de fármacos em matrizes biológicas para fins de monitorização terapêutica, estudos de bioequivalência e análises toxicológicas de urgência.

1.4 Métodos Analíticos

O tratamento prévio de amostras biológicas, que envolve as etapas de eliminação de interferentes (compostos endógenos e/ou outros fármacos que os pacientes podem administrar concomitantemente com os antidepressivos), extração e pré-concentração dos analitos; tem sido um procedimento indispensável e de extrema relevância para o desenvolvimento de métodos cromatográficos com sensibilidade e seletividade analítica, adequados às análises de fármacos no intervalo terapêutico.

A extração líquido-líquido (LLE) [49, 67-72] e a extração em fase sólida (SPE) [73-78] têm sido as técnicas convencionais de preparo de amostra mais utilizadas para a

determinação dos antidepressivos ISRSs em fluidos biológicos. A LLE apresenta limitações relacionadas ao consumo de solventes, exposição do analista a compostos tóxicos, formação de emulsões, dificuldade de automatização, e necessidade de várias etapas para a execução, o que resulta na perda do analito. A SPE apresenta algumas vantagens em relação à LLE, tais como: maiores taxas de recuperação, menor consumo de solventes, ausência da formação de emulsão, menor tempo para a execução, processo mais simples e maior facilidade para automatização da análise.

Vários estudos têm sido realizados na tentativa de desenvolver novos formatos e novas fases extratoras (sorventes) para SPE. No entanto, na maioria das determinações analíticas, são utilizados sorventes convencionais, como os de fase n-alkil-sílica ou copolímeros altamente entrecruzados, nos quais, a retenção do analito é baseada em interações hidrofóbicas. Isso implica em baixa seletividade para análise de traços em amostras complexas (interferentes presentes em altas concentrações). Além disso, a técnica SPE apresenta algumas limitações, tais como: o bloqueio dos poros da fase extratora devido aos componentes da matriz biológica, as variações analíticas entre os cartuchos extratores e as diversas etapas operacionais requeridas para a execução do procedimento da SPE.

A miniaturização das técnicas de preparo de amostra tem sido uma tendência predominante na área de química analítica, destacando-se a microextração em fase sólida (SPME - *solid phase microextraction*), *in-tube* SPME, a extração sortiva em barra de agitação (SBSE - *stir bar sorptive extraction*) e a microextração em sorvente empacotado (MEPS - *microextraction by packed sorbent*). Estas técnicas quando acopladas a sistemas analíticos têm resultado em análises rápidas, baixo consumo de solvente, menor exposição dos analistas aos fluidos biológicos e aos solventes tóxicos, bem como, maior precisão analítica.

A microextração em fase sólida, quando comparada aos métodos convencionais de preparo de amostras, extração líquido-líquido e extração em fase sólida, apresenta uma série

de vantagens, tais como: não requer instrumentação analítica sofisticada; não utiliza solvente orgânico, quando acoplada à cromatografia gasosa (SPME-GC); rápido processo operacional; permite automação das análises, a reutilização das fases extratoras e a integração em um único sistema; além da extração, concentração e introdução da amostra no sistema cromatográfico.

A SPME utiliza uma fibra de sílica fundida recoberta com uma fase extratora polimérica, na qual, os analitos são diretamente extraídos da amostra para o recobrimento da fibra. Consiste de um processo baseado no equilíbrio de partição entre as fases: aquosa (amostra homogênea), polimérica extratora (fibra) e gasosa. Durante a extração em um sistema trifásico considerado ideal, os analitos migram entre as três fases até que o equilíbrio de partição seja atingido. Desta forma, a massa extraída do analito pela fibra está relacionada ao equilíbrio de massas nas fases do sistema [79-89].

A técnica SPME apresenta algumas desvantagens, tais como: baixa estabilidade das fases extratoras na presença de solventes orgânicos ou em solução tampão em valores de pH extremos; número limitado de fases extratoras disponíveis no comércio, as quais são adequadas somente para a análise de analitos não-iônicos; e adsorção irreversível dos compostos endógenos da matriz junto às fases extratoras, diminuindo a eficiência do processo de extração.

Seguindo os fundamentos teóricos da SPME, recentemente foi desenvolvida a extração sortiva em barra de agitação (SBSE).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] MINTZ, J.; MINTZ, L.I.; ARRUDA, M.J.; HWANG, S.S. Treatments of depression and the functional capacity to work. **Archives of General Psychiatry**, v. 49, p. 761-768, 1992.
- [2] AKISKAL, H. S. Transtornos do humor. In: KAPLAN, H. I. e SADOCK, B. J. **Tratado de psiquiatria**. Porto Alegre: Artmed, 1999. p. 1175-1186.
- [3] RODRIGUES, M.J.S.F. O Diagnóstico de depressão. **Psicologia USP**, v. 11, p.155-187, 2000.
- [4] ROUDINESCO, E.; PLON, M. **Dicionário de psicanálise**. Trad. V. RIBEIRO, L. Magalhães. Rio de Janeiro: Jorge Zahar Editor, 1998.
- [5] GINZBURG, J. Conceito de melancolia. **Revista da Associação Psicanalítica de Porto Alegre**, v. 20, p. 102-116, 2001.
- [6] SONENREICH, C.; ESTEVÃO, G.; FRIEDRIC, S.; SILVA FILHO, L.M.A. A evolução histórica do conceito de depressão. **Revista ABP-APAL**, v. 17, p. 29-40, 1995.
- [7] ALONSO-FERNÁNDEZ, F. **Fundamentos de la psiquiatria actual**. v.1 2.ed. Madrid: Paz Montalvo, 1972.
- [8] BARLOW, D. H. **Manual clínico dos transtornos psicológicos**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 1999.
- [9] ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento da CID-10: Descrições clínicas e diretrizes diagnósticas**. PERES, U. T. **Melancolia**. São Paulo: Escuta, 1996.
- [10] BELL, C.C. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision: DSM-IV-TR Quick Reference to the Diagnostic Criteria from DSM-IV-TR. **The Journal of the American Medical Association**, v.258, p. 811-812, 2001.
- [11] VALLADARES, A.; DILLA, T.; SACRISTAN, J. A. Depression: a social mortgage. Latest advances in knowledge of the cost of the disease. **Actas Espanolas de Psiquiatria**, v. 37, p. 49-53, 2009.

- [12] GREENBERG, P.E.; KESSLER, R.C.; BIRNBAUM, H.G.; LEONG, S.A.; LOWE, S.W.; BERGLUND, P.A.; COREY- LISLE, P.K. The economic burden of depression in the United States: How did it change between 1990 and 2000? **Journal of Clinical Psychiatric**, v. 64, p. 1465-1475, 2003.
- [13] SOBOCKI, P.; JÖNSSON, B.; ANGST, J.; REHNBERG, C. Cost of depression in Europe. **The Journal of Mental Health Policy and Economics**, v.9, p. 87-98, 2006.
- [14] TRIVED, J. K.; SHARMA, S.; TANDON, R. Depression in general clinical practice. **Journal of the Indian Medical Association**, v. 102, p. 557-558, 2004.
- [15] GAZALLE, F. K.; HALLAL, P.C.; LIMA, M.S. Depressão na população idosa: os médicos estão investigando? **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, p. 145-149, 2004.
- [16] FERNÁNDEZ, A.; ANGEL, J.; SAAMEÑO, B.; PINTO-MEZA, A.; LUCIANO, J.V.; AUTONELL, J.; PALAO, D.; SALVADOR-CARULLA, L.; CAMPAYO, J. G.; HARO, J. M.; SERRANO, ANTONI. Burden of chronic physical conditions and mental disorders in primary care, and the DASMAM investigators. **The British Journal of Psychiatry**, v. 196, p.302-309, 2010.
- [17] KALIA, M. Neurobiological basis of depression: An update. **Metabolism**, v. 54, p. 24-27, 2005.
- [18] SIMPSON, S.G.; JAMISON, K.R. The Risk of Suicide in Patients with Bipolar Disorders. **Journal of Clinical Psychiatric**, v. 60, p. 53-56, 1999.
- [19] World Organization Health. First Global Mental Health Summit - World Health Organization Warns Depression Looms As Global Crisis (UK): WHO, 2009. Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em: 17/10/2010.
- [20] TAMAI, S. Epidemiologia do Envelhecimento no Brasil. In: FORLENZA, O. V; ALMEIDA, O. P. **Depressão e Demência no Idoso**, 2ª ed. São Paulo: Lemos Editorial, 1999; p. 11-24.
- [21] PACHECO, J. L. **Educação, Trabalho e Envelhecimento**: Estudo das histórias de vida de trabalhadores assalariados e suas relações com a escola, com o trabalho e com os sintomas depressivos, após a aposentadoria. Tese de Doutorado – Educação /Gerontologia. UNICAMP, Campinas, 2002.

[22] FORLENZA, O.V. Transtornos Depressivos em Idosos. In: FORLENZA, O.V.; CARAMELLI, P. **Neuropsiquiatria Geriátrica**. v.1. São Paulo: Atheneu, 2000; p. 299-308.

[23] PEARSON, J. L.; BROWN, G.K. Suicide prevention in late life: directions of suicide for science and practice. **Clinical Psychology Review**, v. 20, p. 685-705, 2000.

[24] BAUER, M.; WHYBROW, P. C.; ANGST, J.; VERSIANI, M.; MÖLLER, H.J. Diretrizes da World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) para tratamento biológico de transtornos depressivos unipolares, 1ª parte: tratamento agudo e de continuação do transtorno depressivo maior. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 36, p. 17-57, 2009.

[25] NASH, J.; NUTT, D. ANTIDEPRESSANTS: SPECIFIC TREATMENT AND DISORDERS. **Psychiatric**, v. 6, p. 289-294, 2007.

[26] ANDERSON, I.M. Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a meta-analysis of efficacy and tolerability. **Journal of Affective Disorders**, v. 58, p.19-36, 2000.

[27] BATEMAN, D. Antidepressants: poisonous substances. **Medicine**, v. 35, p. 587-589, 2007.

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

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

[30] KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H. **Química Farmacêutica**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

[31] BALDESSARINI, R. J. Fármacos e o tratamento dos distúrbios psiquiátricos- depressão e distúrbios de ansiedade. In: HARDMAN, J.; LIMBIRD, L. (Ed). Goodman & Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2003. p. 339-364.

[32] FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia Clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

- [33] VETULANI, J.; NALEPA, I. Antidepressants: past, present and future. **European Journal of Pharmacology**, v. 405, p. 351-363, 2000.
- [34] DEL PORTO, J. A.; MELLO, A. F.; KERR-CORREA, F.; SANTOS, A.; MORENO, R. A.; SANTOS, C. H. R.; CHAVES, A. V.; VERSIANI, M.; NARDI, A. E.; OLIVEIRA I. R.; RIBEIRO, M. G.; KAPCZINSK, F.; GAZALLE, F.; FREY, B.; TAMAI, S. Fluvoxamina no transtorno depressivo maior: um estudo multicêntrico aberto. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v.56, p. 17-22, 2007.
- [35] HIEMKE, C.; HARTTER, S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 85, p. 11-28, 2000.
- [36] STAHL, S.M. Selectivity of SSRIs: individualising patient care through rational treatment choices. **International Journal of Psychiatry in Clinical Practice**, v.8, p. 3-10, 2004.
- [37] STAHL, S.M.; GRADY, M. M. Differences in mechanism of action between current and future antidepressants. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 64, p. 13-17, 2003.
- [38] STAHL, S.M. Symptoms and circuits, part 1: major depressive disorder. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 64, p. 1282-1283, 2003.
- [39] BOURIN M.; DAVID, D.J.; JOLLIET, P.; GARDIER, A. Mechanism of action of antidepressants and therapeutic perspectives. **Therapie**, v. 57, p. 385-96, 2002.
- [40] VASWANI, M.; LINDA, F.K.; RAMESH, S. Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.27, p. 85-102, 2003.
- [41] GOODNICK, P.J.; GOLDSTEIN, B.J. Selective serotonin reuptake inhibitors in affective disorders – I: Basic pharmacology. **Journal of Psychopharmacology**, v.12, p. S3-S20, 1998.
- [42] BROQUET, KE. Status of treatment of depression. **Southern Medical Journal**, v. 92, p. 848-858, 1999.
- [43] WILKINSON, G. R. Farmacocinética. In: GOODMAN GILMAN, A. (eds). **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. p. 03-23.

- [44] NIES, A. S. Princípios da Terapêutica. In: GOODMAN GILMAN, A. (eds). **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. p. 35-50.
- [45] AHN, G.J.; KANG, K.K.; KIM, D.S.; AHN, B.O.; KIM, W.B.; KANG, S.K.; LEE, B.C.; HWANG, W.S. DA-8159 Reverses selective serotonin reuptake inhibitor-induced erectile dysfunction in rats. **Urology**, v. 65, p. 202-207, 2005.
- [46] STELLA, F.; GOBBI, S.; CORAZZA D. I.; COSTA, J. L. R. Depressão no Idoso: Diagnóstico, Tratamento e Benefícios da Atividade Física. **Revista Motriz**, v.8, p. 91-98, 2002.
- [47] WONG, D.T.; BYMASTER, F.P.; ENGLEMAN, E.A. Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. **Life Sciences**, v. 57, p. 411-441, 1995.
- [48] ALTAMURA, A. C.; MORO, A. R.; PERCUDANI, M. Clinical pharmacokinetics of fluoxetine. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 26, p. 201-214, 1994.
- [49] TOURNEL, G.; HOUDRET, N.; HÉDOUIN, V.; DEVEAUX, M.; GOSSET, D.; LHERMITE, M. High-performance liquid chromatographic method to screen and quantitates even selective serotonin reuptake inhibitors in human serum. **Journal of Chromatography B**, v. 761, p. 147-158, 2001.
- [50] BALDESSARINI, R. J. In: GOODMAN GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (eds). Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006.
- [51] YACUBIAN, J.; MINUTENTAG, N. Tratamento dos transtornos do pânico com inibidores seletivos da recaptura de serotonina. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 28, p. 19-22, 2001.
- [52] CARRASCO, J.L; SANDNER, C. Clinical effects of pharmacological variations in selective serotonin reuptake inhibitors: an overview. **International Journal of Clinical Practice**, v. 59, p. 1428-34, 2005.
- [53] SUCAR, D.D. **Fundamentos de interações medicamentosas**. 1ª ed. São Paulo: Lemos Editorial, 2003.

- [54] TIMMER, C. J.; PAANAKKER, J. E.; VRIES, M. V. Mirtazapine pharmacokinetics with two dosage regimens and two pharmaceutical formulation. **Pharmaceutical Research**, v. 14, p. 98-102, 1997.
- [55] DELBRESSINE, L. P. C.; MOONEN, M. E. G.; KASPERSEN, F. M.; WAGENAARS, G.N.; JACOBS, P. L.; TIMMER, C. J.; PAANAKKER, J. E.; HAL, H.J.M.; VOORTMAN, G. Pharmacokinetics and biotransformation of mirtazapine in human volunteers. **Clinical Drug Investigation**, v. 15, p. 45-55, 1998.
- [56] GORDMAN, J. M. Mirtazapine: clinical overview. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 60, p. 9-13, 1999.
- [57] COHEN, M.; PANAGIDES, J.; TIMMER, C. J.; HUISMAN, J. A. M. Pharmacokinetics of mirtazapine from orally administered tablets: influence of high-fat meal. **European Journal of Drug Metabolism Pharmacokinetics**, v. 22, p. 103-110, 1997.
- [58] FAWCETT, J.; BARKIN, R. L. Review of the results from clinical studies on the efficacy, safety and tolerability of mirtazapine for the treatment of patients with major depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 51, p. 267-285, 1998.
- [59] TIMMER, C. J.; AD SITSSEN, J. M.; DELBRESSINE, L. P. Clinical pharmacokinetics of mirtazapine. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 38, p. 461-474, 2000.
- [60] STÖRMER, E.; MOLTKE, L. L.; GREENBLATT, J. Scaling drug biotransformation data from cDNA-expressed cytochrome P-450 to human liver: a comparison of relative activity factors and human liver abundance in studies of mirtazapine metabolism. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 295, p. 793-801, 2000.
- [61] WEST, C.H.K.; RITCHIE, J.C.; BOSS-WILLIAMS, K.A.; WEISS, J.M. Antidepressive drugs with differing pharmacological actions decrease activity of locus coeruleus neurons. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 12, p. 627-641, 2009.
- [62] PRESKORN, S.H. Selection of an antidepressant: mirtazapine. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 58, p. 3-8, 1997.
- [63] BAUMANN, P.; HIEMKE, C.; ULRICH, S.; GAERTNER, I.; RAO, M.L.; ECJERMANN, G.; GERLACH, M.; KUSS, H.J.; LAUX, G.; MÜLLER-OERLINGHAUSEN, B.; RIEDERER, P.; ZERNI, G. Therapeutic monitoring of psychotropic drugs, An outline of the AGNP-TDM Expert Group Consensus Guideline. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 26, p. 167-170, 2004.

[64] LINDER, M.W.; KECK, P.E. Standards of laboratory practice, antidepressant drug monitoring. **Clinical Chemistry**, v. 44, p. 1073-1084, 1998.

[65] PATSALOS, P. N.; BERRY, D. J.; BOURGEOIS, B. F. D.; CLOYD, J. C.; GLAUSER, T. A.; JOHANNESSEN, S. I.; LEPPIK, I. E.; TOMSON, T.; PERUCCA, E. Antiepileptic drugs-best practice guidelines for Therapeutic drug monitoring: A position paper by the Subcommittee on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. **Epilepsia**, v. 49, p.1239-1276, 2008.

[66] MITCHELL, P.B. Therapeutic drug monitoring of psychotropic medications. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 49, p. 303-312, 2000.

[67] CATAI, A. P. F.; CARRILHO, E.; LANÇAS, F. M., QUEIROZ, M. E.C. Fast separation of selective serotonin reuptake inhibitors antidepressants in plasma sample by non aqueous capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 5779-5782, 2009.

[68] GUNNAR, T.; MYKKÄNEN, S.; ARINIEMI, K.; LILLSUNDE, P. Validated semiquantitative/quantitative screening of 51 drugs in whole blood as silylated derivatives by gas chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry and gas chromatography electron capture detection, **Journal of Chromatography B**, v. 806, p. 205-219, 2004.

[69] VLASEA, L.; IMREB, 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.

[70] LACASSIE, E.; GAULIER J.-M.; MARQUET, P.; RABATEL, J.-F., LACHÂTRE, G. Methods for the determination of seven selective serotonin reuptake inhibitors and three active metabolites in human serum using high-performance liquid chromatography and gas chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 742, p. 229-238, 2000.

[71] TITIER, K.; CASTAING, N.; SCOTTO-GOMEZ, E.; PEHOURCQ, F.; MOLIMARD, M. High-Performance liquid chromatographic method with diode array detection for identification and quantification of the eight new antidepressants and five of their active metabolites in plasma after overdose. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 25, p. 581-587, 2003.

[72] DUVERNEUIL, C.; GRANDMAISON, L.; MAZANCOURT, P.; ALVAREZ, J.-C. A high-performance liquid chromatography method with photodiode-array UV detection for therapeutic drug monitoring of the nontricyclic antidepressants drugs. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 25, p. 565-573, 2003.

[73] STURM, S.; HAMMANN, F.; DREWE, J.; MAURER, H.H.; SCHOLER, A. An automated screening method for drugs and toxic compounds in human serum and urine using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 2726-2732, 2010.

[74] WILLE, S. M. R.; MAUDENS, K. E.; VAN PETEGHEM, C. H.; LAMBERT, W. E. E. Development of a solid phase extraction for 13 ‘new’ generation antidepressants and their active metabolites for gas chromatographic–mass spectrometric analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1098, p. 19-29, 2005.

[75] 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.

[76] FRAHNERT, C.; RAO, M. L.; GRASMÄDER, K. Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring. **Journal of Chromatography B**, v. 794, p. 35-47, 2003.

[77] MOLANDER, P.; THOMASSEN, A.; KRISTOFFERSEN, L.; GREIBOKK, T.; LUDANES, 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, 2002.

[78] 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.

[79] EMÍDIO, E. S.; PRATA, V. M.; DÓREA, H. S. Validation of an analytical method for analysis of cannabinoids in hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 670, p. 63-71, 2010.

[80] MOLLER, M.; ALEKSA, K.; WALASEK, P.; KARASKOV, T.; KOREN, G. Solid-phase microextraction for the detection of codeine, morphine and 6-monoacetylmorphine in human hair by gas chromatography-mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 196, p. 64-69, 2010.

[81] RISTICEVIC, S.; NIRI, V. H.; VUCKOVIC, D.; PAWLISZYN, J. Recent developments in solid-phase microextraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 781-795, 2009.

[82] KUMAR, A.; DHINGRA, G.; MALIK, A.K.; TEWARY, D.K. Determination of norfloxacin and enrofloxacin by solid-phase microextraction/high-performance liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 91, p. 1339-1343, 2008.

[83] DIETZ, C.; SANZS, J.; CAMARA, C. Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, p. 183-192, 2006.

[84] ARESTA, A.; PALMISANO, F.; ZAMBONIN, C. G. Determination of naproxen in human urine by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 643- 647, 2005.

[85] QUEIROZ, M. E. C.; LANÇAS, F. M. Practical tips on preparing plasma samples for drug analysis using SPME. **LC-GC North America**, v. 22, p. 970-980, 2004.

[86] QUEIROZ, M. E. C.; VALADÃO, C. A. A.; FARIAS, A.; CARVALHO, D.; LANÇAS, F. M. Determination of amitraz in canine plasma by solid-phase microextraction–gas chromatography with thermionic specific detection, **Journal of Chromatography B**, v. 794, p. 337-342, 2003.

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

[88] QUEIROZ, M. E. C.; CARVALHO, D.; LANÇAS, F. M. Determination of lamotrigine simultaneously with carbamazepine, carbamazepine epoxide, phenytoin, phenobarbital, and primidone in human plasma by SPME–GC–TSD. **Journal of Chromatographic Science**, v. 40, p. 219-223, 2002.

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

Capítulo 2

*Desenvolvimento de barras de agitação para
extração sortiva com anticorpos monoclonais e
policlonais anti-fluoxetina como fase
imunosorvente, em conjunto ao sistema
cromatográfico LC-*F*D para análise de fluoxetina
em amostras de plasma*

1 INTRODUÇÃO

1.1 Extração sortiva em barra de agitação

1.1.1 Fundamentos Teóricos

A extração sortiva em barra de agitação (SBSE), introduzida no final dos anos noventa por Baltussen *et al* [1], destaca-se como uma versátil técnica de preparo de amostra, para a pré-concentração de compostos orgânicos presentes em matrizes biológicas [2,3]. A SBSE baseia-se no equilíbrio de partição do analito nas distintas fases presentes no sistema analítico.

No processo SBSE é utilizada uma barra de agitação magnética (magneto encapsulado com vidro, 10 a 20 mm de comprimento) revestida com 25-125 μL (0,3-1,0 mm de espessura) de filme de polidimetilsiloxano (PDMS), única fase extratora disponível comercialmente (Gerstel GmbH Müllheim Ruhr, Germany) [1]. Para evitar a decomposição da fase polimérica em contato direto com o magneto, este é encapsulado com vidro (**Figura 2.1**). As extremidades da barra não são revestidas com o polímero.

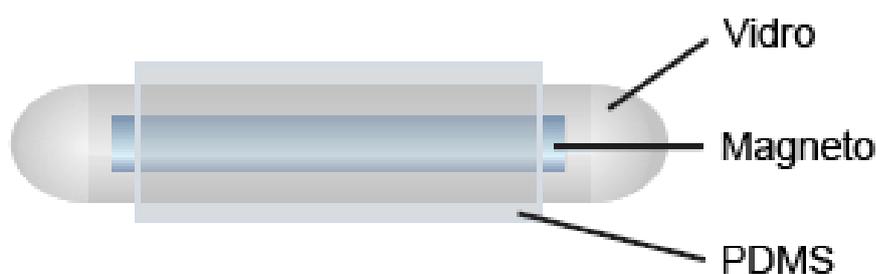


Figura 2.1 Representação esquemática da barra de agitação SBSE.

O PDMS foi selecionado como fase extratora para SBSE, em razão de características específicas, tais como, boa estabilidade térmica e propriedades de difusão. Os fragmentos de massas da degradação do polímero são característicos do silicone, os quais podem ser facilmente distinguidos com o uso de detector de massas.

O mecanismo de extração dos analitos é baseado na absorção (processo de partição), ou seja, os analitos são solubilizados na fase polimérica. A força de retenção, no processo de absorção, é mais fraca, quando comparada à observada no processo de adsorção, o que permite rápida dessorção térmica dos analitos em temperaturas medianas, minimizando a perda de analitos termolábeis.

O equilíbrio de partição ou capacidade de retenção de um determinado analito em PDMS, não é influenciado pela presença de outros analitos, ou interferentes da matriz. Os analitos apresentam diferentes equilíbrios de partição (constante de partição) com a fase PDMS, não ocorre competição ou deslocamento dos analitos (que apresentam menor constante de partição) da fase extratora, o que resulta em métodos analíticos com ampla faixa de linearidade. Nas fases absorventes, a degradação de analitos instáveis é menor ou ausente.

A SBSE é controlada pelo coeficiente de partição dos analitos entre as fases, PDMS e aquosa ($K_{PDMS/w}$), o qual tem sido correlacionado com o coeficiente de distribuição octanol/água ($K_{o/w}$). O coeficiente de partição $K_{PDMS/w}$ é determinado através da razão entre a concentração do analito na fase de PDMS (C_{PDMS}) e a concentração do analito na amostra aquosa (C_w), após atingir o equilíbrio de partição. Esta razão corresponde ao produto do quociente entre as massas do analito na fase PDMS (m_{PDMS}) e na fase aquosa (m_w) e β , onde β é igual à razão entre o volume da amostra e volume da fase extratora ($\beta=V_w/V_{PDMS}$). Tais correlações são ilustradas na **Equação 1**.

$$K_{o/w} \approx K_{PDMS/w} = \frac{C_{PDMS}}{C_w} = \left(\frac{m_{PDMS}}{m_w} \right) \left(\frac{V_w}{V_{PDMS}} \right) = \beta \left(\frac{m_{PDMS}}{m_w} \right) \quad \text{(Equação 1)}$$

A taxa de recuperação do processo SBSE é expressa através da razão entre a quantidade de analito extraído (m_{PDMS}) pela fase PDMS e a quantidade de analito inicial na amostra ($m_o = m_{PDMS} + m_w$), que corresponde às correlações entre K_{PDMS} e β , conforme ilustra a **Equação 2**.

$$\frac{m_{PDMS}}{m_o} = \frac{\left(\frac{K_{PDMS/w}}{\beta} \right)}{1 + \left(\frac{K_{PDMS/w}}{\beta} \right)} \quad \text{(Equação 2)}$$

De acordo com a **Equação 2**, as taxas de recuperação do analito nas extrações SBSE estão relacionadas diretamente aos valores de $K_{PDMS/w}$ e β , ou seja, quanto maior o volume de PDMS (menor o valor β), maior será a quantidade de analito extraído. Uma vez que o valor de $K_{PDMS/w}$ é similar ao valor de $K_{o/w}$ (**Equação 1**), $K_{PDMS/w} / \beta$ pode ser representado por $K_{o/w} / \beta$ [1].

As fibras utilizadas em SPME apresentam volume de revestimento PDMS de aproximadamente 0,5 μL ; já na técnica SBSE, a barra de agitação tem sido revestida com PDMS, utilizando 50 a 220 μL . Consequentemente, a sensibilidade analítica aumenta de 100 a 1000 vezes [1].

Segundo Baltussen *et al* [1], para processo SBSE que apresenta $K_{o/w} / \beta = 1$, a recuperação do analito será de 50%, e em valores de $K_{o/w} / \beta$ superiores a 5, a extração é considerada quantitativa. O valor de β , ou seja, a razão entre os volumes da amostra e da fase PDMS, deverá ser otimizado para cada aplicação, na qual o tempo da extração também deverá ser considerado. O aumento do volume da amostra e de PDMS resultará em maior tempo de extração para atingir o equilíbrio de partição. David e Sandra [4] descreveram que para

analitos apolares ($\log K_{o/w} > 3$), o aumento da quantidade de analito extraído é proporcional ao aumento do volume da amostra.

1.1.2 Processo SBSE e aplicações

Para extrações SBSE, a barra de agitação magnética revestida com PDMS é inserida diretamente na amostra (DI) (**Figura 2.2A**) ou no *headspace* do frasco (**Figura 2.2B**) e agitada até atingir o equilíbrio de partição dos analitos entre a amostra e a fase PDMS. Nas extrações DI, o frasco extrator (com tampa rosca) é colocado sobre o agitador magnético e a amostra é agitada com velocidade (rpm) e tempo previamente otimizados, dependendo do volume de amostra.

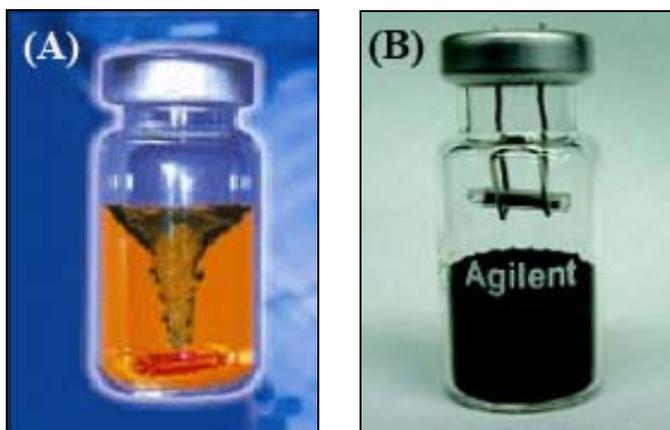


Figura 2.2 Processo SBSE: (A) extração no modo direto e (B) extração por *headspace*. Extraído de [5].

Após o processo de extração, a barra de PDMS é retirada do frasco, com auxílio de uma pinça ou de uma haste metálica, enxaguada com água ultrapura e cuidadosamente seca com lenço de papel. Para extrações de compostos voláteis de amostras sólidas ou líquidas, a barra SBSE tem sido colocada no *headspace* do frasco com auxílio de um suporte especial.

Dependendo da complexidade da amostra e dos cuidados dos analistas, as barras SBSE têm sido reutilizadas de 20 a 100 vezes.

Os analitos voláteis e semivoláteis têm sido termicamente desorvidos no injetor de um cromatógrafo a gás, resultando em uma técnica simples e de alta sensibilidade analítica. Para a dessorção térmica, a barra SBSE é transferida para um tubo capilar de vidro (4 mm d.i. e 187 mm comprimento) [Figura 2.3], que é inserido no sistema de dessorção térmica SBSE, ou injetor especial do cromatógrafo gasoso.

O sistema de dessorção térmica consiste de dois injetores (vaporizadores) (TDS-2) em série com temperatura programada (PTV), no primeiro injetor, os analitos da barra SBSE são termicamente desorvidos (exemplo: 40°C - 50°C/min - 250°C); já no segundo módulo do injetor (CIS-4, PTV), ocorre a reconcentração criogênica dos analitos desorvidos termicamente. Durante a rápida dessorção térmica (vazão superior 100 mL/min), o módulo CIS-4 é mantido a temperaturas negativas (abaixo de -150°C) com nitrogênio líquido.

Para análises de analitos muito voláteis, o *liner* do injetor CIS-4 tem sido empacotado com material adsorvente (geralmente, Tenax TA), para eficiente reconcentração dos analitos. Após completar o programa de dessorção térmica, a temperatura do CIS-4 é aumentada rapidamente a altos valores (exemplo: 10°C/s até 250°C). Os analitos são transferidos do TSD-2 para CIS-4, geralmente no modo de injeção *splitless*, para a coluna analítica (Figura 2.3) [6].

Para as análises SBSE/LC de compostos termolábeis ou de alta massa molar, o processo de dessorção SBSE tem sido realizado através da inserção da barra SBSE em um tubo contendo poucos μL de fase líquida, fase móvel, ou solvente orgânico, com agitação magnética ou em banho de ultrassom (Figura 2.4), com ou sem controle da temperatura. Poucas referências bibliográficas descrevem a técnica SBSE/LC empregando o processo de dessorção em fase líquida.

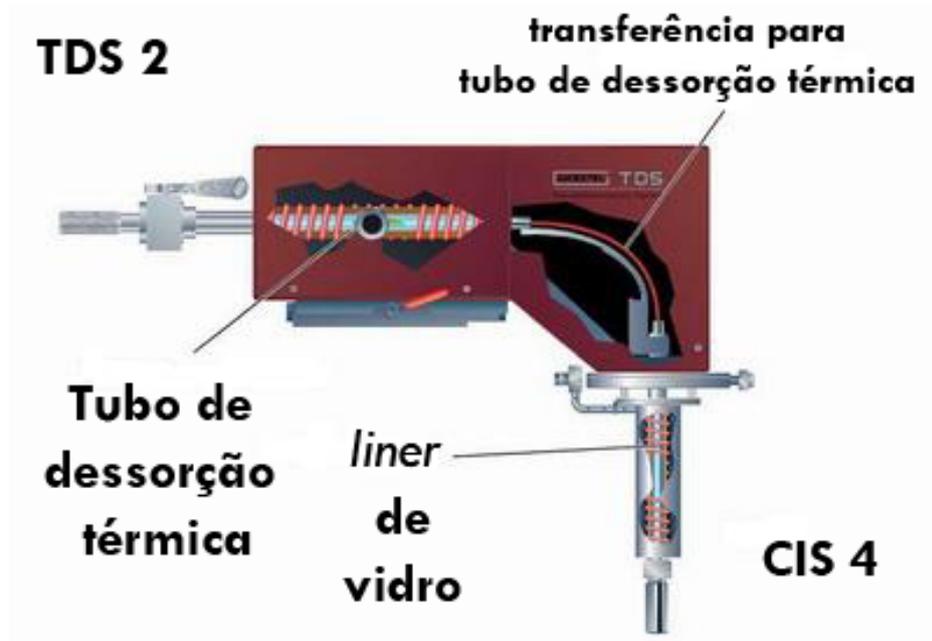
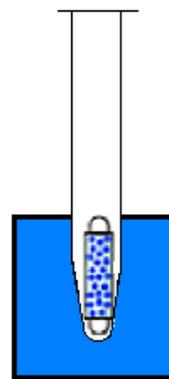


Figura 2.3 Sistema de dessorção térmica SBSE. Adaptado de [6].

dessorção líquida



ultrassom

Figura 2.4 Processo SBSE: dessorção líquida em banho de ultrassom (com ou sem controle de temperatura).

As reações de derivatização pré-extração, *in situ*, ou durante o processo de dessorção térmica, com a introdução do reagente derivatizante no tubo capilar de vidro, têm ampliado as áreas de aplicações da técnica SBSE/TD-GC, para a análise de compostos polares.

Para os processos de derivatização *in situ*, os ácidos e aminas tem sido derivatizados com cloroformiato de etila e os grupos hidroxil (fenóis) acilados com anidrido acético [4]. O reagente de sililação, *N, O*-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida, em razão de sua alta volatilidade, tem sido utilizado nos processos de derivatização no tubo capilar durante a dessorção térmica. Para aumentar a estabilidade da reação, lã de quartzo tem sido adicionada ao tubo de dessorção térmica (**Figura 2.5**) [7].

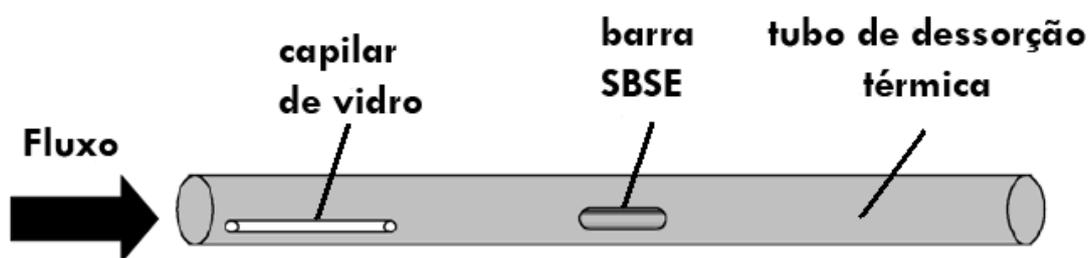


Figura 2.5 Esquema do processo de derivatização no capilar, durante a dessorção térmica. Adaptado de [7].

A SBSE tem sido empregada com êxito para análise de diversos tipos de compostos em fluidos biológicos, conforme ilustrado na **Tabela 2.1**.

Tabela 2.1 Aplicações da técnica SBSE (barra comercial) para análise de diferentes compostos em fluidos biológicos.

Analito	Matriz	Vol. de amostra	Derivatização	Dessorção	Análise	LOD	Referência
Antidepressivos	Plasma, Urina e amostras de tecido cerebral	1 mL 100 mg	-	LD	LC-FD	0,2-2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1-10 $\mu\text{g L}^{-1}$ 2-20 ng g^{-1} (LOQ)	Barrio <i>et al</i> (2010) [3]
Rifampicina	Plasma	0,2 mL	-	LD	LC-UV	0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (LOQ)	Queiroz <i>et al</i> (2010) [2]
Carbamazepina e fenobarbital; fenitoína	Plasma	1 mL	-	LD	LC-UV	0,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (LOQ)	Queiroz <i>et al</i> (2008) [8]
Fluoxetina	Plasma	1 mL	<i>In situ</i> formação carbamato: ECF: EtOH: Py	TD LD	GC-MS	TD: 0,46 ng L^{-1} LD: 10 ng L^{-1}	Lanças <i>et al</i> (2008) [9]
Triclosan	Saliva	1 mL	-	LD	LC-DAD	0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$	Nogueira <i>et al</i> (2008) [10]
Triclosan	Urina	1 mL	-	TD	GC-MS	0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$	Nakazawa <i>et al</i> (2008) [11]
Antidepressivos	Plasma	1 mL	-	LD	LC-UV	15-40 ng mL^{-1} (LOQ)	Queiroz <i>et al</i> (2007) [12]
Estrona; 17- β -estradiol	Urina	1 mL	<i>Pré-in situ</i> : AAA; Na ₂ CO ₃ Pós-acetilação- HS: AAA; Py	TD	GC-MS	0,02-0,03 $\mu\text{g L}^{-1}$	Sandra <i>et al</i> (2007) [13]
Testosterona	Urina	15 mL	-	TD	GC-MS	0,9-2,8 $\mu\text{g L}^{-1}$	Sandra <i>et al</i> (2007) [14]
Glicuronídeo 4-nonilfenol (4-NPG) e 4-glicuronídeo octilfenol (4-OPG)	Urina	1 mL	<i>In-tube</i> : BSTFA	TD	GC-MS	0,01-0,11 $\mu\text{g L}^{-1}$	Kawaguchi <i>et al</i> (2007) [15]
4-hidroxinonenal	Urina	1 mL	<i>Pré-in situ</i> PFBHA; Py+AAA;Py	TD	GC-MS	22,5 ng L^{-1}	Sandra <i>et al</i> (2006) [16]

Continua **Tabela 2.1** ...

...Continuação da Tabela 2.1.

Analito	Matriz	Vol. de amostra	Derivatização	Dessorção	Análise	LOD	Referência
Fármacos básicos	Amostras forenses	-	-	TD	GC-MS	-	Janssen <i>et al</i> (2006) [17]
Fluoxetina	Plasma humano	1 mL	-	LD	LC-MS	3 µg L ⁻¹	Lanças <i>et al</i> (2006) [18]
Hormônios sexuais	Água Urina	30 mL	-	LD	LC-DAD	0,3-1,0 µg L ⁻¹	Nogueira <i>et al</i> (2006) [19]
Glicuronídeo nonilfenol (4-NPG)	Urina humana	1 mL	-	TD	GC-MS	0,2 µg L ⁻¹	Nakazawa <i>et al</i> (2006) [20]
Ácido tuberculostático	Amostras de muco	2 mL	<i>In situ</i> : ECF; EtOH; Py	TD	GC-MS	0,2 ng mL ⁻¹	Sandra <i>et al.</i> (2005) [21]
Clorofenóis	Água; urina	10; 2 mL	<i>In situ</i> acetilação: AAA; Na ₂ CO ₃	TD	GC-MS	1-2 ng L ⁻¹ 10-20 ng L ⁻¹	Nakazawa <i>et al</i> (2005) [22]
Compostos orgânicos voláteis	Urina	0,5 mL	-	TD	GC-MS	-	Novotny <i>et al</i> (2005) [23]
Xenostrogênicos fenólicos	Urina	-	<i>Pré-in situ</i> acetilação: AAA; K ₂ CO ₃	TD	GC-MS	10-50 ng L ⁻¹	Nakazawa <i>et al</i> (2005) [24]
Bisfenol A	Água e amostras de fluidos corporais	2-50 mL água e 0,2-1 mL fluidos	<i>In situ</i> AAA; Na ₂ CO ₃ ou NaHCO ₃	TD	GC-MS	1-5 ng L ⁻¹ água 20-100 ng L ⁻¹ fluidos	Nakazawa <i>et al</i> (2004) [25]
Nonilfenóis e 4-ter-octilfenol	Urina e plasma humano	1 mL	-	TD	GC-MS	0,2 ng mL ⁻¹ 0,02 ng mL ⁻¹	Nakazawa <i>et al</i> (2004) [26]
1-hidroxi pireno	Urina	10 mL	<i>In situ</i> AAA; KHCO ₃	TD	GC-MS	2 ng L ⁻¹	Sandra <i>et al</i> (2003) [27]
Drogas de abuso	Fluidos biológicos	5 mL	<i>In situ</i> : ECF, <i>in situ</i> : AAA	TD	GC-MS	< 5 µg L ⁻¹	Sandra <i>et al</i> (2003) [28]
Fármacos	Urina	5 mL	<i>In situ</i> : AAA, <i>in situ</i> : ECF	TD	GC-MS	< 1 µg L ⁻¹	Sandra <i>et al</i> (2003) [29]
Barbituratos	Urina	5 mL	-	TD	GC-MS	12 ng L ⁻¹	Liebich <i>et al</i> (2002) [30]
Cafeína e teofilina	Sangue humano	-	-	TD	GC-MS	0,06-0,4 mg L ⁻¹	Sato <i>et al</i> (2002) [31]
Esteróides, fármacos	Fluidos biológicos	5 mL	<i>In situ</i> : ECF <i>In situ</i> : AAA	TD	GC-MS	-	Sandra <i>et al</i> (2002) [32]

Continua Tabela 2.1...

...Continuação da **Tabela 2.1**.

Analito	Matriz	Vol. de amostra	Derivatização	Dessorção	Análise	LOD	Referência
Ftalatos e metabólitos	Fluidos corporais	5 mL		TD	GC-MS	-	Liebich <i>et al</i> (2002) [33]
Bifenilas policloradas	Esperma	1 mL	-	TD	GC-MS	0,1 ng L ⁻¹	Sandra <i>et al</i> (2001) [34]

AAA: ácido acético anidrido; **DAD:** detector de arranjo de diodos; **ECF:** cloroformiato de etila; **GC-MS:** cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa; **LC-MS:** cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa; **LC-UV:** cromatografia líquida acoplada ao detector ultravioleta; **LD:** dessorção líquida; **LOD:** limite de detecção; **LOQ:** limite de quantificação; **TD:** dessorção térmica; **PFBHA:** pentafluorobenzil hidroxilamina; **Py:** piridina; **HS:** *headspace*.

1.1.3 Fases SBSE seletivas

Como o polímero PDMS é a única fase SBSE disponível no mercado, recentemente, alguns pesquisadores, em busca de fases extratoras mais seletivas para análises de fármacos em fluidos biológicos, desenvolveram barras SBSE *labmade* com fases extratoras mais polares, biocompatíveis ou com fases mistas, nas quais foram observados diferentes mecanismos de extração.

Lambert *et al* [35] desenvolveram uma barra SBSE revestida com material de acesso restrito (RAM) para minimizar o efeito das proteínas dos fluidos biológicos nas análises de cafeína e metabólitos em amostras de urina. A fase RAM possui superfície hidrofílica biocompatível na parte externa e, hidrofóbica na parte interna dos poros da partícula do sorvente. Simultaneamente ao processo de exclusão de proteínas, os analitos foram extraídos pela fase octadecilsilano através do processo de partição.

Huang *et al* [36] desenvolveram uma barra SBSE com revestimento de fase monolítica para a determinação de hormônios esteroidais em urina. O material monolítico foi obtido através da copolimerização *in situ* de metacrilato de octadecil e dimetacrilato de etileno na

presença de solventes porogênicos (1-propanol; 1, 4- butanodiol e água). Foi avaliada a influência dos parâmetros da polimerização (diferentes concentrações dos monômeros e de porogênio) e da espessura do material (1,0-2,0 mm), na eficiência dos processos de adsorção e dessorção líquida.

Queiroz *et al* [37] desenvolveram um revestimento misto de PDMS e polipirrol (PPY) para a análise SBSE/LC-UV de antidepressivos em amostras de plasma. O método padronizado apresentou limites de quantificação de 20 ng mL⁻¹ a 50 ng mL⁻¹, adequados para análise de antidepressivos em amostras de plasma de pacientes idosos no intervalo terapêutico. As extrações foram baseadas nos processos de adsorção (PPY) e absorção (PDMS).

A **Tabela 2.2** sumariza as aplicações da técnica SBSE com barras *labmade* para análise de fármacos em amostras de fluidos biológicos.

Tabela 2.2 Aplicações da técnica SBSE com barras *labmade* para análise de fármacos em fluidos biológicos.

Analitos	Amostras	Condições SBSE	Sistema Analítico	Referência
Antidepressivos	Plasma de pacientes idosos	Fase: PPY/PDMS 40 min, pH 9,0; 40°C Dessorção Fase móvel, 15 min	LC-UV LOQ: 20-50 ng mL ⁻¹	Queiroz <i>et al</i> (2009) [37]
Hormônios esteroidais	Urina	Fase: poli(ácido metacrilato de estearil éster-etileno dimetilacrilato) 2 h, 600 rpm dessorção: 10 mL; metanol, 2h	LC-DAD LOD: 1,8-6,6 pg mL ⁻¹	Huang <i>et al</i> (2008) [36]
Cafeína e metabólitos	Plasma de rato	Fase: C18 – ADS Adição 10% metanol, 30 min, 1000 rpm Dessorção acetonitrila/água 20 min, 1000 rpm	LC-DAD LOD: 25 ng mL ⁻¹ cafeína	Lambert <i>et al</i> (2005) [35]

ADS: alquil-diol sílica; **LC-DAD:** cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos; **LC-UV:** cromatografia líquida com detector ultravioleta; **LOD:** limite de detecção; **LOQ:** limite de quantificação; **PDMS:** polidimetilsiloxano; **PPY:** polipirrol.

1.2 Fases extratoras de imunoafinidade

Desde a última década, houve um aumento no interesse pelo desenvolvimento de sorventes específicos, chamados de imunosorventes. A extração com imunosorventes, que se baseia em interações específicas entre antígeno e anticorpo, em conjunto com as técnicas cromatográficas, têm resultado em metodologias de alta seletividade e sensibilidade analítica. Esses parâmetros são de extrema relevância para as análises de fármacos em amostras complexas, tais como os fluidos biológicos, nos quais os analitos de interesse estão quase sempre presentes em níveis de traços.

Farjam *et al* (1988) foram os pioneiros na descrição das vantagens da extração por imunoafinidade hifenada à cromatografia líquida (LC) para a determinação de estrogênios e nortestosterona em plasma e urina [38-40] e aflatoxinas em leite [41-43].

Na literatura, podemos encontrar vários métodos cromatográficos que utilizam a extração por imunoafinidade nos campos farmacêutico e biomédico. No entanto, o maior número de aplicações ainda pertence às análises ambientais [44-69].

1.2.1 Anticorpos e Antígenos ^[70-76]

Os anticorpos pertencem a uma família de glicoproteínas relacionadas estruturalmente, chamadas imunoglobulinas (Ig) e, são produzidos pelos animais em resposta à presença de substâncias estranhas denominadas imunógenos ou antígenos. As imunoglobulinas estão presentes no soro sanguíneo de todos os vertebrados.

Na maioria dos animais superiores, cinco classes distintas de moléculas de imunoglobulinas são conhecidas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, diferenciando-se umas das outras

em tamanho, carga, composição de aminoácidos e conteúdo de carboidratos. A maioria das imunoglobulinas pertence à classe das IgG e possui unicamente a unidade básica de quatro cadeias, consistindo de duas cadeias polipeptídicas leves idênticas, e outras duas pesadas, também idênticas (contendo 214 e 450-650 aminoácidos, respectivamente).

As cadeias pesadas estão unidas entre si por ligações de dissulfeto (-S-S-) e cada uma delas está unida, por sua vez, a uma cadeia leve, por ligações de dissulfeto e interações não-covalentes. A unidade básica é simétrica, isto é, cada metade contém uma cadeia leve e outra pesada, resultando em uma estrutura em forma de Y (**Figura 2.6**). A IgG (massa molar: 150 kD e ponto isoelétrico: 4,0-8,6) é a imunoglobulina predominante em todas as idades e, na idade adulta, responde por 75 a 80% das imunoglobulinas totais.

Nos trabalhos da literatura, os quais reportam o uso da técnica de imunoafinidade, a imunoglobulina do tipo G tem sido a mais utilizada.

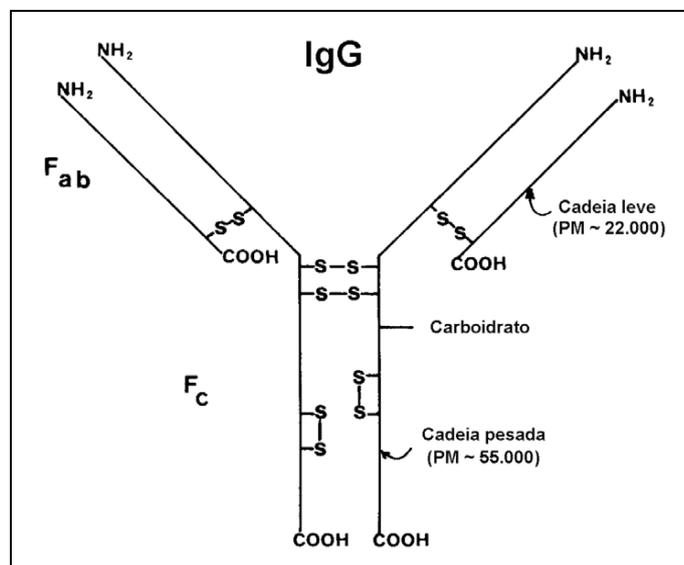


Figura 2.6 Estrutura básica de uma imunoglobulina do tipo G. F_{ab}: fragmento que contém o sítio de ligação do antígeno, determinante do anticorpo: a parte aminoterminal deste fragmento realiza o reconhecimento e permite o acoplamento com o antígeno. F_c: fração constante da cadeia pesada, cuja função específica é a regulação da imunoresposta frente ao hospedeiro [70].

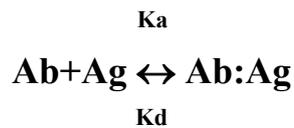
A parte aminoterminal dos domínios das cadeias pesadas e leves do F_{ab} é responsável pelo reconhecimento e pela união do antígeno, denominando-se domínio V (F_v , fração variável), que possui sequências variáveis de aminoácidos e serve para acoplar o anticorpo de uma superfície complementar ao antígeno (interação “chave-fechadura”).

As propriedades específicas para ligação de um antígeno em uma molécula de IgG, são dadas pelo arranjo tridimensional, inerente à sequência de aminoácidos das regiões variáveis das duas cadeias leves e pesadas da molécula. Esta porção da Ig é chamada determinante idiotípico ou idiotipo. Apenas um determinante antigênico terá um perfeito encaixe com esta disposição, garantindo assim, uma grande especificidade na resposta imune. O restante da molécula de Ig de qualquer classe é relativamente constante.

Ainda que o antígeno utilizado para imunizar o animal seja bastante puro, o imunosoro obtido é sempre constituído por uma mistura de anticorpos dirigidos contra os diferentes epítomos. Estes são tanto mais numerosos, quanto mais complexo for o antígeno; por estas razões são chamados anticorpos policlonais. São uma mistura complexa de anticorpos distintos, produzidos por clones individuais de linfócitos B. Já os anticorpos monoclonais são obtidos por um único clone de linfócitos B, apresentam maior especificidade do que os policlonais, afinidade por um epítomo específico e menor probabilidade de reatividade cruzada entre antígenos similares.

1.2.1.1 Interação antígeno-anticorpo ^[77]

A ligação do anticorpo (Ab) ao antígeno (Ag), que resulta na formação de um complexo, nomeadamente antígeno-anticorpo (Ab:Ag), estão descritas nas **Equações 3**.



$$K_e = k_a / K_d \quad \text{Equação 3 (a)}$$

$$K_e = [\text{Ab:Ag}] / [\text{Ab}] [\text{Ag}] \quad \text{Equação 3 (b)}$$

onde:

K_e = constante de equilíbrio

K_a = constante de velocidade de 2ª ordem para a associação do Ab com o Ag ($M^{-1}s^{-1}$)

K_d = constante de velocidade de 1ª ordem para a dissociação do complexo Ab:Ag (s^{-1})

Ab:Ag = concentração molar do complexo anticorpo-antígeno no equilíbrio

[Ab] = concentração molar do anticorpo no equilíbrio

[Ag] = concentração molar do antígeno no equilíbrio

A interação antígeno-anticorpo apresenta elevada constante de associação (baixa constante de dissociação): 10^{-8} a $10^{-6} M^{-1}$ para anticorpos policlonais e 10^{-12} a $10^{-8} M^{-1}$ para anticorpos monoclonais. Isso resulta em ligações extremamente fortes entre o antígeno e o anticorpo, tais como: ligações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas e interações de Van der Waals.

1.2.2 Imunosorvente ^[78,79]

O imunosorvente utilizado para a extração de imunoafinidade é produzido pela imobilização do anticorpo em um suporte rígido. Tanto o material do suporte quanto o método

de imobilização, empregado para acoplar o anticorpo ao suporte sólido, são fundamentais para um processo eficiente de imunoextração.

A capacidade total de ligação de um imunosorvente é determinada pelo número de sítios ativos de ligação que, em geral, correspondem a uma pequena fração do número total de sítios imobilizados. A simetria dos fragmentos F_{ab} na molécula de anticorpo determina a estequiometria teórica de ligação antígeno-anticorpo de 2:1. As capacidades típicas de ligação para anticorpos acoplados covalentemente correspondem, em média, a 30% de sua capacidade teórica.

1.2.2.1 Produção dos anticorpos ^[69,76]

A primeira etapa no desenvolvimento do imunosorvente tem sido a obtenção do anticorpo específico com capacidade de reconhecimento molecular de um analito ou um grupo de analitos.

No entanto, como os compostos de baixa massa molar, como os fármacos, poluentes ambientais ou pesticidas, são incapazes de evocar uma resposta imune (haptenos), quando introduzidos em animais de laboratório (coelhos ou camundongos), os antígenos devem, desta forma, ser modificados através da ligação a uma molécula carreadora, como a soroalbumina bovina (BSA), ovalbumina (OVA), ou hemocianina (KLH).

Animais, como coelhos ou camundongos, são imunizados com este conjugado (antígeno-molécula carreadora) e, no tempo adequado, o sistema imune destes animais produz um número diferente de moléculas IgG contra todas as partes das moléculas do conjugado. As amostras de sangue dos animais são coletadas, após um determinado tempo, para obter os anticorpos produzidos contra o antígeno.

1.2.2.2 Imunoensaios ^[80-82]

Após a produção de anticorpos, é necessário que se faça a avaliação da especificidade dos mesmos contra o analito-alvo. Esta avaliação pode ser realizada através de imunoensaios, dentre os quais o mais empregado é o método ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*).

O ensaio imunoenzimático é um método em que a reação antígeno-anticorpo é monitorada pela medida da atividade enzimática, utilizando a conversão de um substrato (cromogênico, fluorescente ou quimioluminescente) por um antígeno ou anticorpo marcado com a enzima como meio de detecção/quantificação do analito. Os imunoensaios apresentam alta sensibilidade, especificidade e facilidade na execução e ainda, permitem a quantificação do analito em níveis de ng ou pg.

A enzima utilizada no ensaio ELISA deve apresentar alta atividade específica e o produto da reação enzimática deve ser estável e de fácil quantificação. Esta deve ser facilmente conjugada a vários antígenos, anticorpos e haptenos, sem perda da atividade, e ter custo acessível.

Várias enzimas podem ser utilizadas no ensaio ELISA, como a peroxidase, fosfatase alcalina, β -galactosidase, entre outras, porém, a enzima mais comumente utilizada nestes ensaios é a peroxidase que catalisa a reação de desdobramento da água oxigenada.

Para determinar o título de anticorpos utiliza-se, comumente, o método ELISA indireto. Faz-se a sensibilização da fase sólida (microplaca de poliestireno) com o antígeno. Em seguida são adicionados em cada etapa: **(1)** soro contendo anticorpos Ag-específicos; **(2)** conjugado constituído de anticorpo marcado com peroxidase (anticorpo secundário); **(3)** adição de cromógeno; **(4)** bloqueio da reação e **(5)** leitura da absorbância do produto final colorido.

Uma vez verificada a especificidade dos anticorpos produzidos contra o analito de interesse, os mesmos são submetidos a processos de purificação, tais como: técnicas cromatográficas (cromatografia de afinidade, troca-iônica, filtração em gel, interação hidrofóbica), eletroforese, centrifugação, precipitação salina (geralmente com sulfato de amônio) e/ou outros métodos. A purificação de biomoléculas exige o emprego de algumas técnicas, cuja escolha depende da natureza e das características das amostras, assim como do grau de pureza desejado no produto final.

1.2.2.3 Suportes de imunoafinidade ^[83-86]

O suporte sólido a ser utilizado na imunoextração para a interação antígeno-anticorpo deve ter poros suficientemente grandes para permitir o acesso do anticorpo ao antígeno, tal que, este último, possa difundir livremente, ligar-se e, posteriormente, dissociar-se do anticorpo.

Porém, um suporte muito poroso pode perder estabilidade mecânica e, portanto, ser submetido à compactação com conseqüente comprometimento de sua capacidade. Os suportes não-porosos também podem ser usados, mas, nesses casos, a acessibilidade do anticorpo e do antígeno é menor, entretanto, toda a superfície é acessível a ambos. O suporte sólido deve conter grupos funcionais tais que, a superfície possa ser ativada para uma subsequente imobilização do ligante via uma ligação estável. Este suporte também deve ser quimicamente e biologicamente inerte e hidrofílico para limitar as interações não-específicas.

Os principais suportes empregados na maioria das aplicações de imunoextração são os polímeros à base de carboidratos, como agarose ou celulose, suportes orgânicos sintéticos, como polímeros, copolímeros e derivados de acrilamida e polimetacrilato. Os polímeros orgânicos são de baixa eficiência e têm sido utilizados sob influência da gravidade, do fluxo peristáltico ou em baixo vácuo. As principais desvantagens desses materiais são sua limitada

estabilidade em altos fluxos e pressões; e suas baixas propriedades de transferência de massa. Estes fatores limitam a utilização desses suportes para cromatografia de imunoafinidade em sistemas de cromatografia líquida.

Já os materiais mais rígidos e de alta eficiência, como derivados de sílica, vidro e certas matrizes orgânicas, como pérolas de azalactona ou meios de perfusão baseados em poliestireno, podem ser utilizados em sistemas LC com maior eficiência.

As dimensões dos poros da sílica gel são um excelente “recheio” para colunas de afinidade. Grande área superficial, rigidez estrutural (resistentes às pressões), rápida transferência de massa, variedade de tamanho da partícula e dos poros e alta pureza são características propícias que fazem com que a sílica seja um suporte ideal. Obviamente, a superfície da sílica deve ser tratada de forma adequada para que interações não-específicas sejam eliminadas. Uma desvantagem da sílica como fase estacionária de imunosorvente é a faixa de pH limitada.

Os imunosorventes têm sido utilizados como fase estacionária para coluna cromatográfica de LC ou como fase extratora para SPE, em sistemas *off line* (separadamente à análise cromatográfica) ou *on line* SPE-LC.

1.2.2.4 Métodos de imobilização do anticorpo ^[87-91]

O anticorpo a ser imobilizado pode ser poli ou monoclonal. Ambos resultam em imunosorventes eficientes, sendo os anticorpos monoclonais superiores aos policlonais, em virtude de sua maior especificidade (reconhecimento de um único sítio) e capacidade de ligação.

Por outro lado, do ponto de vista da praticidade, os anticorpos policlonais são mais simples de serem produzidos. Entretanto, a fonte de um anticorpo policlonal é finita e a necessidade de imunizar vários animais pode levar a variações na quantidade e qualidade do

anticorpo. Já as células de hibridoma (híbrido resultante da fusão de células B, produtoras de um anticorpo, com células tumorais neoplásicas) que secretam anticorpo monoclonal, podem ser estocadas em nitrogênio líquido, disponibilizando dessa forma, uma fonte de anticorpo por muitos anos.

A imobilização do anticorpo à fase sólida tem sido realizada, em geral, por um dos seguintes métodos:

- a) absorção física do Ab à fase sólida;
- b) acoplamento químico do Ab à fase sólida;
- c) acoplamento químico covalente sítio-dirigido do Ab (nativo ou oxidado) realizado direta ou indiretamente via um polímero, metal ou ponte de proteína.

Nas duas primeiras estratégias de imobilização (**a** e **b**), ao contrário da última (**c**), a interação do Ab com a fase sólida é inespecífica, o que não permite a determinação da orientação do Ab imobilizado. Desta forma, a fração do Ab que permanecerá funcional em acoplamentos desses tipos, não é previsível. Portanto, há a possibilidade de que uma fração significativa das regiões de ligação do Ab ao Ag esteja estericamente “escondida”.

Já no caso de acoplamento orientado, a capacidade de ligação do Ag é de duas a oito vezes maior em relação aos métodos de acoplamento randômico, dada a possibilidade de obter melhor acessibilidade estérica aos sítios ativos de ligação.

A **Figura 2.7** ilustra as possíveis orientações de uma IgG imobilizada em um material de suporte sólido. Em (**a**), o anticorpo é ligado ao suporte através da região F_{ab} e ambos os sítios de ligação do antígeno estão indisponíveis. Em (**b**), os sítios de ligação estão parcialmente disponíveis e em (**c**), o anticorpo é ligado à fase estacionária através da região F_c com ambos os sítios de ligação disponíveis.

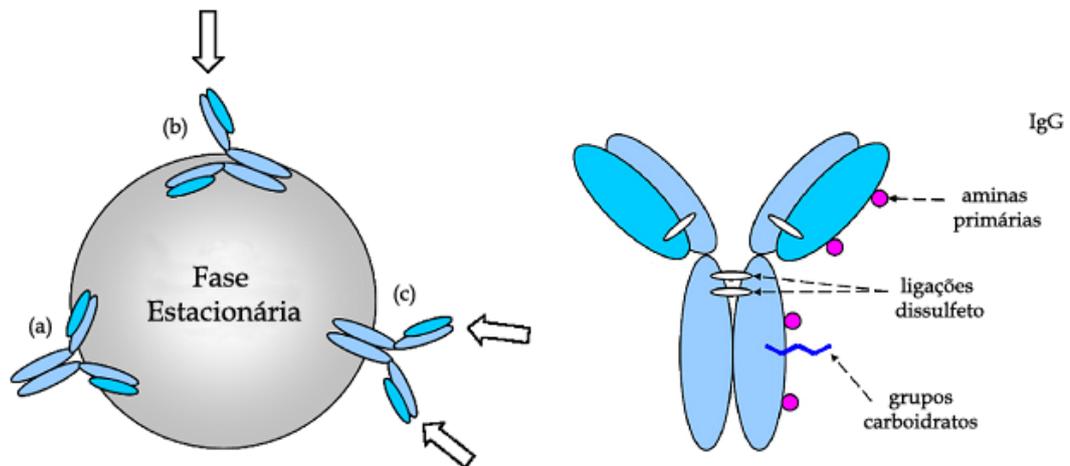


Figura 2.7 Imunoglobulina imobilizada no suporte e reconhecimento pelo antígeno. As setas indicam os sítios disponíveis de ligação do antígeno. Adaptado de [91].

O acoplamento do anticorpo ao suporte se dá via resíduos reativos, sobretudo grupos amino da lisina, presentes por toda a molécula do anticorpo; grupos carboxílicos de aspartato e glutamato, encontrados na região F_c , covalentemente ligados às cadeias polipeptídicas do anticorpo; e a grupos fenólicos das tirosinas. Os imunosorventes preparados pela região de carboidratos da molécula de IgG mostram aumento significativo na capacidade de ligação ao antígeno em relação àqueles preparados através do acoplamento pelas aminas primárias da molécula de IgG. O acoplamento ocorre ou pela ativação da matriz ou mediante reagente de acoplamento.

No caso da imobilização do anticorpo por absorção física, uma severa limitação é a perda do anticorpo imobilizado durante a etapa de eluição do antígeno, uma vez que as ligações não-covalentes que ligam o anticorpo à fase sólida são análogas àquelas que ligam o anticorpo ao antígeno. Já nos dois outros métodos de acoplamento, o anticorpo imobilizado é retido durante a eluição do antígeno, permitindo a regeneração da coluna de afinidade.

A reação de acoplamento não-sítio dirigido que liga o anticorpo covalentemente à fase sólida, utiliza reagentes ativadores, em geral, de três tipos:

- a) ativadores solúveis que permitem acoplamento químico entre grupos funcionais, em geral, um grupo NH_2 de um componente com um grupo $-\text{COOH}$ de outro, como o brometo de cianogênio (CNBr) e a carbodiimida (EDAC).;
- b) ativadores solúveis que funcionam como ligação entre grupos funcionais idênticos ou diferentes, como glutaraldeído e ácido maléico que atuam como ligação entre dois grupos amina ou o *N*-succinimidil 4-maleimidobutirato, que liga grupos tiol do suporte a grupos amino da proteína e;
- c) ativadores ligados à fase sólida incluem polímeros com grupos ativos (p. ex., epóxi-derivados) que permitem acoplamento covalente a grupos $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$ da proteína.

Quando o procedimento de imobilização do Ab é sítio-dirigido, os sítios de ligação do Ab ficam expostos à fase móvel, fora da superfície sólida, o que garante boa acessibilidade estérica aos sítios ativos de ligação. Dentre as estratégias de imobilização orientada, destacam-se:

- a) acoplamento direto à fase sólida: a região F_c do anticorpo é oxidada com periodato, formando grupos aldeído que são ligados quimicamente ao suporte sólido (a imobilização neste caso, depende da concentração do periodato, pH da reação, tempo e temperatura);
- b) acoplamento via pontes de proteína: proteína A com alta afinidade de ligação por grupos amino da porção F_c do Ab, tem sido usada como braço espaçador bioespecífico para orientar o Ab na fase sólida. Também tem sido usada proteína G biotinilada ligada à avidina, previamente acoplada à fase sólida;
- c) Acoplamento a suportes carregados com metais: essa estratégia baseia-se na interação de resíduos de histidina com metal e expõe o anticorpo à concentrações baixas de reagentes oxidantes.

As condições de imobilização devem manter a atividade bioespecífica dos anticorpos. As condições adequadas de ligação devem ser em meio aquoso, em unidades de pH de 0,5 a 2,0 a partir do ponto isoelétrico dos anticorpos, com uma força iônica de 0,01-0,05, à temperatura de 4-25°C e, com uma reação de tempo limitado (menos de 16 h).

1.2.2.5 Etapas do processo de imunoextração ^[92]

Há 4 etapas básicas na utilização dos imunosorventes para o processo de isolamento do analito (**Figura 2.8**). Etapa **A**: ilustra um cartucho empacotado com anticorpo. Etapa **B**: A amostra líquida que contém o analito (antígeno) e os compostos interferentes em uma mistura é carregada no cartucho.

Através da escolha do tampão adequado e condições de fase móvel, frequentemente na faixa do pH fisiológico (pH 7,0-7,4), o antígeno se liga firmemente ao anticorpo na superfície do empacotamento, enquanto os interferentes são eliminados na solução. Na realidade, alguns dos interferentes podem se ligar ao sorvente por outros mecanismos.

Na etapa **C**: as partículas são lavadas com tampão adicional, deixando o analito que ainda está fortemente ligado ao imunosorvente.

Na etapa **D**, o antígeno é eluído do cartucho através do ajuste das condições de eluição para romper a forte ligação entre antígeno-anticorpo que envolve uma combinação de forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio, van der Waals e outras forças. O solvente de eluição deve ser escolhido de forma que libere o antígeno, na garantia que estas forças sejam superadas pelo solvente e, que o analito possa ser eluído no menor volume possível.

As condições como: o uso de compostos caotrópicos e outros substituintes (um composto que induz uma forte interação bioespecífica com o anticorpo); mudanças no pH; adição de misturas de solventes orgânicos para romper as interações hidrofóbicas; concentração de sal; e mudanças de temperatura; são as comumente utilizadas para o

rompimento da interação antígeno-anticorpo. Deve-se ter cuidado para não mudar tão drasticamente as condições das imobilizações dos anticorpos, devido à possibilidade de desnaturação dos mesmos.

Após a etapa **D**, o imunosorvente deve ser regenerado para que possa ser usado para uma outra amostra. A regeneração do anticorpo ligante é acompanhada pela adição da aplicação do tampão inicial ao cartucho.

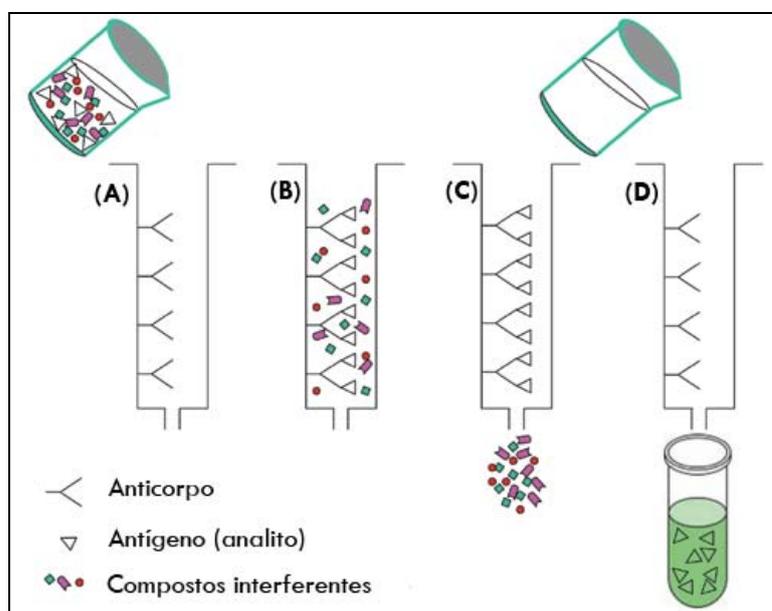


Figura 2.8 Etapas da extração dos analitos através da SPE de imunoafinidade. Adaptado de [92].

A **Tabela 2.3** apresenta uma revisão da literatura em relação ao uso de imunosorventes em fluidos biológicos para análise de uma ampla variedade de analitos.

Tabela 2.3 Aplicações de imunosorventes para a análise de uma ampla variedade de analitos em fluidos biológicos.

Analito (antígeno)	Matriz	Solvente de Eluição	Suporte sólido (ativação)	Técnica de separação	LOD	Referência
Epitestosterona	Urina	MeOH-H ₂ O (8:2)	Sepharose 4 B (CNBr)	LC-UV	1 ng mL ⁻¹ (LOQ)	Zhang <i>et al</i> 2010 [93]
Estrona, 17-β estradiol e estrona 3-sulfato	Plasma	Dietil éter	Affigel-10	LC-MS/MS	0,189 pg mL ⁻¹ 0,706 pg mL ⁻¹ 0,333 pg mL ⁻¹ (LOQ)	Goto <i>et al</i> 2010 [94]
Epitestosterona	Urina	MeOH	Nanopartículas de ouro (2-aminoetanotiol)	LC-UV	0,06 ng mL ⁻¹	Zhang <i>et al</i> 2010 [95]
Testosterona	Urina	MeOH-H ₂ O (8:2)	Capilar monolítico [VDA-co-HEMA-co-EDMA] (γ-MAPS)	CE-LIF	70 nM	Zhang <i>et al</i> 2009 [96]
Testosterona	Urina	EtOH 50%+NH ₄ OH 30 mM pH 9,5	Sepharose Quelada	PF-MEKC	35 µg L ⁻¹	Sirén <i>et al</i> 2007 [97]
Clorofenol	Urina	Glicina+HCl	Sepharose (NHS)	GC-MS (ECD)	0,2 µg L ⁻¹	Marco <i>et al</i> 2005 [98]
Bisfenol A	Soro	MeOH-H ₂ O (4:1)	Sepharose 4 B (CNBr)	LC-UV	N.D.	Chang <i>et al</i> 2003 [99]
Trembolona	Urina	MeOH-H ₂ O (7:3)	Radox Labs	LC-UV	2 ng mL ⁻¹	Fesser <i>et al</i> 2002 [100]
β-estradiol	Soro	MeOH-H ₂ O (8:2)	Alumina recoberta com polímero hidrofílico (hidrazida ou aldeído)	LC-UV	2 ng mL ⁻¹	Raeds <i>et al</i> 2001 [101]
Solanidina	Soro	MeOH	Silica (carboxilato), Sepharose (CNBr)	LC-MS	1 ng mL ⁻¹	Sporns <i>et al</i> 2001 [102]

Continua **Tabela 2.3...**

...Continuação da Tabela 2.3.

Analito (antígeno)	Matriz	Solvente de Eluição	Suporte sólido (ativação)	Técnica de separação	LOD	Referência
Sarafloxacin	Soro	Ácido acético 2%+ fosfato de sódio 0,1 M (pH 6)	Poliestireno-divinilbenzeno	LC-FD	5 ng mL ⁻¹	Stanker <i>et al</i> 2000 [103]
Morfina	Sangue	MeOH- tampão glicina 0,2 M, NaCl 0,05 M, HCl pH 2,0 0,1 M (9:1)	Polímero Tris-acril (CDI)	LC-FD	3 ng g ⁻¹	Blaschke <i>et al</i> 1999 [104]
Benzo(a)pireno	Urina	MeOH	<i>Affinica Kit</i> (imobilização orientada)	LC-FD	0,7 pg mL ⁻¹	Ovrebo <i>et al</i> 1999 [105]
Salbutamol	Urina	EtOH-tampão acetato 0,03 M pH 4 (8:2)	<i>Fractoprep</i>	LC-EC	4 ng mL ⁻¹	Zeeuw <i>et al</i> 1999 [106]
Tetrodoxina	Urina	Ácido acético 1%	Sepharose (NHS)	LC-FD	2 ng mL ⁻¹	Hamano <i>et al</i> 1999 [107]
Morfina	Urina	PBS (pH 4)-EtOH (6:4)	Sílica (aldeído)	LC-EC	50 ng mL ⁻¹	Stevenson <i>et al</i> 1998 [108]
Hormônios	Urina	MeOH-H ₂ O (8:2)	Sepharose 4 B (CNBr)	GC-MS	2 ng mL ⁻¹	Graeve <i>et al</i> 1998 [109]
Aflatoxina	Urina	MeCN	<i>Aflaprep</i> (Rhone Diagn. Tech)	LC-FD	1 pg mL ⁻¹	Nilsson <i>et al</i> 1998 [110]
Bufuralol	Plasma	Tampão acetato de amônio (pH 5,0)-MeOH (5:95)	Vidro	LC-UV	N.D.	Goto <i>et al</i> 1998 [111]
Dexametasona	Urina	MeOH-ácido propiônico 1 M (1:1)	Polihidroxietil metacrilato	LC-MS	3 ng mL ⁻¹	Seymour <i>et al</i> 1998 [112]
Benzodiazepínicos	Urina	MeOH-H ₂ O (9:1)	Suporte (glutaraldeído)	LC-UV	2 ng mL ⁻¹	Machbert <i>et al</i> 1997 [113]
Clenbuterol	Urina	Ácido acético 2%	Sepharose (proteína G)	LC-MS/MS	50 ng L ⁻¹	Henion <i>et al</i> 1997 [114]
LSD	Urina	Ácido acético 2%	Sílica (Proteína G)	LC-MS/MS	2,5 ng L ⁻¹	Henion 1996 [115]
Metanfetamina	Urina	Tampão acetato de sódio pH 3,5	Vidro (DITC)	CE-UV	N.D.	Advis <i>et al</i> 1991 [116]
Oestrógeno	Urina	H ₂ O-MeCN (95:5)	Sepharose 4 B (CNBr)	LC-UV	200 ng L ⁻¹	Farjam <i>et al</i> 1991 [117]

LOD: Limite de detecção; **N.D.:** Não disponível; **EC:** detector eletroquímico; **FD:** detector de fluorescência; **MS:** detector por espectrometria de massas; **CE:** eletroforese capilar; **LIF:** detector de fluorescência induzida por laser; **UV:** detector ultravioleta; **Em itálico:** imunosorventes comerciais; **CDI:** carbonildiimidazol; **DITC:** 1,4-fenileno diisotiocianato; **MECK:** cromatografia capilar eletrocínética micelar; **PF:** preenchimento parcial; **VDA-co-HEMA-co-EDMA:** poli (2-vinil-4,4-dimetilazlactona- co -2- hidroxietilmetacrilato - co-etilenodimetacrilato; **γ -MAPS:** 3-metacriloxipropil-trimetoxissilano; **LSD:** dietilamida do ácido lisérgico.

Mais recentemente, os imunosorventes têm sido empregados junto à técnica de microextração em fase sólida (SPME), os quais têm resultado em um alto grau de enriquecimento molecular seletivo (e/ou específico), parâmetros essenciais para a análise de fármacos em amostras complexas, como os fluidos biológicos [118-121].

Pawsliszyn *et al* [118] combinaram as vantagens dos imunosorventes à técnica de microextração em fase sólida: anti-soro de teofilina foi covalentemente imobilizado na superfície da fibra de sílica fundida e usado como um meio de extração sensível e seletivo para a microextração em fase sólida de imunoafinidade na determinação de teofilina em amostras de soro. Em estudos mais recentes, Pawsliszyn *et al* [119,120] analisaram uma classe de benzodiazepínicos em urina através de SPME de imunoafinidade. Queiroz *et al* [121] desenvolveram capilares de sílica com anticorpos policlonais imobilizados para análise SPME *in-tube* acoplada ao LC/MS para análise de fluoxetina em amostras de soro humano.

Neste trabalho, uma nova fase seletiva (imunosorvente) foi desenvolvida para aumentar a versatilidade da técnica extração sortiva em barra de agitação, através da imobilização de anticorpos policlonais e monoclonais anti-fluoxetina na superfície vítrea da barra SBSE. A técnica de preparo de amostra seletiva/específica (imunoextração) em conjunto com a cromatografia líquida com detector de fluorescência (SBSE/LC) foi utilizada para análise de fluoxetina em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica.

2 OBJETIVOS

- 2.1 Imunização de coelhos, utilizando fluoxetina conjugada à albumina de soro bovino, como imunogênio, para a produção de anticorpos anti-fluoxetina;
- 2.2 Desenvolvimento de placas de ELISA com adição de antígeno (fluoxetina conjugada à ovalbumina metilada) para detecção (especificidade) e avaliação da atividade dos anticorpos anti-fluoxetina;
- 2.3 Purificação dos anticorpos anti-fluoxetina por cromatografia de afinidade através de colunas *labmade*;
- 2.4 Desenvolvimento da barra extratora (SBSE) com a fase imunosorvente, através da imobilização de anticorpos policlonais e monoclonais anti-fluoxetina;
- 2.5 Avaliação da morfologia da superfície da barra SBSE imunosorvente através de Microscopia Eletrônica de Varredura;
- 2.6 Avaliação da superfície funcionalizada da barra SBSE através de ensaio enzimático com peroxidase (HRP);
- 2.7 Otimização das variáveis SBSE imunosorvente;
- 2.8 Otimização e validação do método SBSE/LC-FD de imunoafinidade para análise de fluoxetina em amostras de plasma;
- 2.9 Aplicação do método SBSE/LC-FD de imunoafinidade desenvolvido para análise de amostras de plasma de pacientes idosos em terapia com fluoxetina para fins de monitorização terapêutica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes, padrões primários e equipamentos

- ⇒ Metanol grau HPLC, J.T. Baker;
- ⇒ Acetonitrila grau HPLC, Merck;
- ⇒ Etanol grau HPLC, J.T. Baker;
- ⇒ Etanolamina, Fluka;
- ⇒ Fosfato monobásico de potássio, Dinâmica Reagentes Analíticos;
- ⇒ Fosfato dibásico de sódio, J.T. Baker;
- ⇒ Cloreto de potássio, Dinâmica Reagentes Analíticos;
- ⇒ Cloreto de sódio, J.T. Baker;
- ⇒ Ácido sulfúrico p.a., J. T. Baker;
- ⇒ Ácido clorídrico p.a., J. T. Baker;
- ⇒ 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, Sigma-Aldrich;
- ⇒ Ácido 2-(*N*- morfolino) etanosulfônico, Sigma-Aldrich;
- ⇒ 3-aminopropiltrietoxissilano 99%, Aldrich;
- ⇒ TRIS-HCl, Sigma;
- ⇒ *N*-hidroxisuccinimida, Pierce;
- ⇒ Anidrido succínico > 99%, Sigma-Aldrich;
- ⇒ Glutaraldeído grau II 25 %, J.T. Baker;
- ⇒ Peróxido de hidrogênio 30%, Carlo Erba;
- ⇒ Placas de ELISA BD Falcon™ 96-well ELISA Microplates, Flat-bottom;
- ⇒ Soroalbumina bovina ≥ 98%, Sigma;
- ⇒ Ovalbumina ≥ 98%, Sigma;
- ⇒ Nitrogênio (g) ultrapuro, White Martins;
- ⇒ Ortofenilenodiamino, Sigma;

- ⇒ Enzima peroxidase (HRP), Sigma;
- ⇒ Sepharose 4B, Sigma;
- ⇒ CH-Sepharose 4B, Sigma;
- ⇒ Amido Black, Sigma-Aldrich;
- ⇒ Ácido acético, J.T. Baker;
- ⇒ Cloreto de guanidino ultrapuro, GIBCO BRL;
- ⇒ Dioxano anidro p.a., Merck;
- ⇒ Sephadex G-25, Sigma-Aldrich;
- ⇒ Estufa a vácuo FANEM;
- ⇒ Bomba PRIMAR modelo 141 2 VC;
- ⇒ Agitador Fisatom 752A;
- ⇒ Centrífuga modelo 5415 C Eppendorf;
- ⇒ Centrífuga refrigerada Eppendorf Centrifuge 5417R;
- ⇒ Ultrassom Ultrasonic Cleaner Unique;
- ⇒ Filtro Millipak[®] 40 0,22 µm Sterile Millipore;
- ⇒ Membrana HV (durepore) em PVDF 0,45 µm Millipore[™];
- ⇒ Agitador de tubos AP 56 Phoenix;
- ⇒ Balança GEHAKA modelo AG200;
- ⇒ Bomba FANEM Diapump modelo 089-CAL;
- ⇒ Balança Marte modelo AM-220;
- ⇒ pHmetro Ultra Basic - Denver Instrument;
- ⇒ Monodestilador 3000 N Brand;
- ⇒ Padrões de fluoxetina e norfluoxetina > 97%, Sigma-Aldrich.

As soluções padrão diluídas da fluoxetina foram preparadas, considerando o intervalo terapêutico, a partir da diluição de solução estoque de 1 mg mL^{-1} em metanol. Estas soluções foram estocadas a 4°C e protegidas da luz. A estabilidade das soluções foi verificada periodicamente durante os ensaios.

A água deionizada de alta pureza (resistividade $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) utilizada nos ensaios deste trabalho foi purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore[®], Brasil). As soluções tampão foram preparadas mensalmente, armazenadas sob refrigeração e ao abrigo da luz.

3.2 Amostras de plasma branco de referência

As amostras de plasma branco de referência, livres do fármaco em análise, e sorologia negativa para hepatites B e C, HIV, chagas, HTLV I/II, TGP e sífilis foram cedidas pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto-USP.

3.3 Amostras de plasmas de pacientes

As amostras de plasmas de pacientes idosos em tratamento com fluoxetina foram gentilmente cedidas pela Prof^ª. Dr^ª. Regina Helena Costa Queiroz do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Essas amostras foram coletadas segundo critérios estabelecidos pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

As amostras de plasma foram coletadas, após 12 horas da última administração do medicamento, dos pacientes em terapia com os fármacos, durante o período mínimo de duas semanas.

3.4 Preparo do imunógeno e imunização dos coelhos

Para a produção dos anticorpos policlonais que foram desenvolvidos em coelhos, a fluoxetina foi conjugada à albumina de soro bovino (BSA), para a obtenção de molécula imunogênica.

O conjugado BSA-fluoxetina foi preparado através da incubação de 10 mg de BSA com 40 mg de fluoxetina na presença de 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ em 2,0 mL de tampão ácido 2-(*N*-morfolino) etanosulfônico (tampão MES), pH 5,5; por 5 horas à temperatura ambiente, sob agitação. O conjugado precipitado obtido por centrifugação foi lavado 8 vezes sob agitação com solução de NaCl $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ e, armazenado a 4°C até a utilização.

Para a imunização, foi utilizado o protocolo convencional com Adjuvante de Freund, o qual consistiu em três imunizações sucessivas de 1,0 mg do conjugado BSA-fluoxetina em 1 mL de emulsão adjuvante, uma a cada três semanas. A emulsão foi aplicada nos animais por via subcutânea em cinco ou seis pontos na região lombar. A primeira coleta de sangue foi realizada 90 dias após a primeira imunização.

O uso de experimentos com coelhos para o desenvolvimento deste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

3.5 Detecção e atividade dos anticorpos anti-fluoxetina

Para a avaliação da especificidade e da atividade de anticorpos anti-fluoxetina, o ensaio ELISA foi realizado em placa de poliestireno com 96 poços de fundo chato (ELISA BD Falcon™ 96-well ELISA Microplates, Flat-bottom).

Para a realização do imunoenensaio ELISA, o conjugado ovalbumina metilada-fluoxetina (antígeno) foi preparado de maneira semelhante ao descrito no **item 3.4** para obtenção do conjugado BSA-fluoxetina. O conjugado OVA-fluoxetina foi então solubilizado em 20 mL de cloreto de guanidino (7 mol L^{-1}) e 20 mL de tampão TBS (Tris-salina) 20 mmol L^{-1} pH 8,1, e usado para detecção de anticorpos anti-fluoxetina.

Inicialmente, os poços da placa foram revestidos com $75 \mu\text{L}$ /poço desta solução do conjugado. Em uma etapa seguinte, as soluções de revestimento foram aspiradas e, os poços foram lavados com TBS 20 mmol L^{-1} pH 8,1 ($300 \mu\text{L}$ /poço). Subsequentemente, os sítios remanescentes da superfície foram bloqueados com $300 \mu\text{L}$ de solução de leite desnatado 5% em tampão TBS 20 mmol L^{-1} (pH 8,1) durante 3h. Em seguida, os poços foram lavados com tampão TBS 20 mmol L^{-1} pH 8,1 e com água ultrapura. Posteriormente, a placa foi seca à temperatura ambiente (12 h) para a realização do teste ELISA.

As soluções com diluições seriais (num fator de $\frac{1}{2}$) de anticorpos policlonais anti-fluoxetina (partindo de uma solução de 20 mg mL^{-1}) foram preparadas em solução de leite desnatado 5%, e posteriormente, estas foram incubadas na **coluna 1**, nas **linhas de A a G** (**Figura 2.9**). Na **coluna 2**, foram incubadas soluções com diluições seriadas de *anticorpos normais* de coelho, não específicos para fluoxetina, (**linhas A a G**). As **colunas 3 e 5** receberam o mesmo tratamento da **coluna 1**, porém com adição de fluoxetina livre ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$). Na **4ª coluna**, foi incubado apenas solução de leite desnatado 5%. Na última **linha (H)** de todas as **colunas (1 a 5)**, os poços da placa foram incubados apenas com solução de leite desnatado 5%. Para identificação dos anticorpos de coelho ligados à placa, utilizou-se solução de anticorpo secundário IgG de carneiro anti-IgG de coelho marcada com enzima peroxidase e diluída 1:5000 (v/v) em TBS 20 mmol L^{-1} pH 7,2. O substrato cromogênico para peroxidase usado para revelação da placa continha 20 mg de ortofenilenodiamino (OPD) dissolvido em 1,0 mL de metanol e $50 \mu\text{L}$ de H_2O_2 em 20 mL de tampão TBS 25 mmol L^{-1}

pH 7,2. A **Figura 2.9** mostra a placa de poliestireno com 96 poços, utilizada no imunoenensaio ELISA para a detecção dos anticorpos anti-fluoxetina.

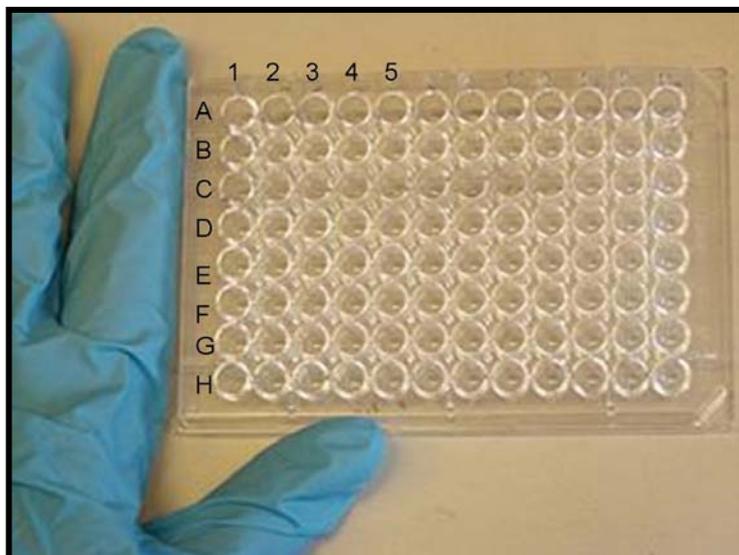


Figura 2.9 Foto da placa de ELISA, sem tratamento prévio, utilizada na detecção dos anticorpos anti-fluoxetina. Poços individuais são identificados pelas coordenadas das **linhas A-H** e **colunas 1-5**.

3.6 Purificação do imunosoro

Uma vez obtido o imunosoro e verificada sua especificidade pelo ensaio ELISA, seguiu-se a purificação dos anticorpos anti-fluoxetina através da combinação sequencial das técnicas de precipitação de proteína com sulfato de amônio e cromatografia de afinidade em colunas *labmade*.

3.6.1 Precipitação com sulfato de amônio

A primeira etapa de fracionamento do imunosoro foi realizada através da precipitação seletiva de imunoglobulinas com sulfato de amônio a partir de 20 mL de soro bruto provenientes de dois coelhos imunizados. A este volume de soro resfriado em banho de gelo e

sob agitação magnética suave, foram adicionados 6,6 mL de solução de sulfato de amônio saturado à temperatura ambiente para atingir 25% de saturação deste sal. Após 30 min em repouso em banho de gelo, a solução foi centrifugada a 1.500 x g por 10 min sob refrigeração e o precipitado formado descartado. Ao sobrenadante recuperado, 25 mL, adicionou-se 3,2 mL de solução saturada de sulfato de amônio, como descrito acima, para que a solução atingisse 33% de saturação de sulfato de amônio, condição em que as imunoglobulinas de coelho precipitam; após incubação em banho de gelo e centrifugação desta solução, o precipitado formado foi recuperado e dissolvido em 1,4 mL de salina. Esta solução foi dialisada contra 1 L de solução salina gelada durante a noite e, em seguida, contra 1 L de tampão PBS (tampão fosfato salino pH 7,4) por 24 h na geladeira. Esta solução de anticorpos de coelho foi diluída para 10 mL com tampão PBS e armazenada a 4°C até o uso.

3.6.2 Desenvolvimento das colunas de afinidade *labmade*

Para a purificação dos anticorpos anti-fluoxetina por cromatografia de afinidade foram desenvolvidas e avaliadas duas colunas de afinidade *labmade* por modificação da resina Sepharose, que foram rotuladas como Seph-BSA-FLX e Seph- ϵ AC-FLX, cujas estratégias de imobilização do fármaco utilizaram braços espaçadores distintos e diferentes técnicas de acoplamento à resina.

Em ambos os casos, o fármaco fluoxetina (FLX) foi ligado através de ligações amida formadas entre seu grupo amina secundária e grupos carboxílicos dos braços espaçadores soro albumina bovina (BSA) ou ácido ϵ -aminocapróico (ϵ AC) previamente acoplados à resina.

As colunas de plástico utilizadas para o empacotamento das colunas de afinidade bem como os filtros inferior e superior foram obtidos da Supelco[®].

3.6.2.1 Desenvolvimento da Sepharose- ϵ AC-FLX

Após a lavagem de 2 mL de Sepharose 6B com 20 mL de H₂O destilada em funil de placa porosa, a resina foi transferida para um frasco plástico de 50 mL e, suspensa em 1,5 mL de NaOH 1 mol L⁻¹ contendo 3 mg de NaBH₄; procedeu-se então a ativação da resina com 0,5 mL de 1,4-butanediol diglicidil éter (bisepóxi) por 5 h, sob agitação suave. Posteriormente, lavou-se a resina ativada com 30 mL de H₂O destilada. O braço espaçador ácido ϵ -aminocapróico foi acoplado incubando-se a resina ativada por bisepóxi com 5 mL de solução de ácido ϵ -aminocapróico 1 mol L⁻¹ preparado em NaHCO₃ 0,5 mol L⁻¹, pH 10, *overnight*. Os grupos epóxi remanescentes na resina foram bloqueados durante 30 min após adição de 0,05 mL de 2-mercaptoetanol à suspensão, e a resina foi lavada com H₂O destilada para remoção do excesso de reagentes. A fluoxetina foi então ligada incubando-se a resina Sepharose-bisepóxi- ϵ AC por 24 h com 0,1 mol L⁻¹ do fármaco preparado em tampão MES, pH 4,5 (0,1 mol L⁻¹) na presença de EDAC (0,1 mol L⁻¹), sob agitação rotatória, à temperatura ambiente. Após adição de 0,25 mL de etanolamina 1 mol L⁻¹ para bloqueio de grupos carboxílicos ativados remanescentes, a resina foi lavada sucessivamente com 10 mL das seguintes soluções: NaCl 0,15 mol L⁻¹; Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, pH 8,1; NaCl 0,15 mol L⁻¹; tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 2,0; e NaCl 0,15 mol L⁻¹. A resina empacotada em coluna foi mantida em geladeira antes do uso.

3.6.2.2 Desenvolvimento da Sepharose-BSA-FLX

Após a lavagem de 2 mL de CH-Sepharose com 10 mL de HCl 0,2 mol L⁻¹ e 20 mL de H₂O destilada em funil de placa porosa, a resina foi equilibrada com dioxano anidro e transferida para frasco plástico de 50 mL. Os grupos carboxílicos da resina foram ativados na presença de NHS 0,1 mol L⁻¹ e EDAC 0,1 mol L⁻¹ durante 60 min à temperatura ambiente,

sob agitação suave. Após a remoção do excesso de reagentes com dioxano, a resina ativada como éster de NHS foi equilibrada em H₂O destilada e o braço espaçador BSA ligado por incubação durante 24 h, na geladeira, com 5 mL de solução da proteína preparada em tampão bicarbonato 0,1 mol L⁻¹, pH 8. Após a remoção do excesso de proteína e tampão, com H₂O destilada, a fluoxetina foi acoplada à Sepharose-BSA de maneira análoga à descrita no item **3.6.2.1** para Sepharose-bisepóxi-εAC. A resina empacotada em coluna foi mantida em geladeira antes do uso.

3.6.3 Purificação dos anticorpos anti-fluoxetina através de coluna de afinidade *labmade*

Inicialmente, as amostras de soro de coelho que continham os anticorpos anti-fluoxetina (previamente purificados por precipitação com sulfato de amônio) foram aplicadas nas duas colunas de afinidade (Sepharose-εAC-FLX e Sepharose-BSA-FLX). Posteriormente, as colunas foram lavadas com PBS (2x vol. de coluna). Na etapa seguinte, os anticorpos foram eluídos com 250 µL de tampão fostato pH 2,0 (0,1 mol L⁻¹) e coletados em microtubos (Eppendorf®) contendo 70 µL de tampão fostato pH 7,5 (1 mol L⁻¹) a fim de restaurar a atividade do anticorpo, uma vez que o pH deve ser neutro. Posteriormente, as colunas de afinidade foram lavadas com PBS, reequilibradas com salina e armazenadas a 4°C. A **Figura 2.10** representa o esquema das etapas do processo de purificação dos anticorpos por coluna de afinidade.

As frações dos anticorpos eluídos nas diferentes colunas de afinidade foram avaliadas por *dot* de acordo com o seguinte procedimento: 5µL de cada fração coletada a partir da eluição foram aplicados sobre uma membrana de nitrocelulose *Hybond ECL* (Amersham®). A revelação (procedimento de descoloração) foi realizado com amido black+ácido acético 7%. Os microtubos que continham as frações com anticorpos específicos purificados foram

dosadas em um espectrofotômetro UV-VIS (Biofotômetro Eppendorf), utilizando o comprimento de onda de 280 nm. Para o cálculo das concentrações dos anticorpos purificados (mg mL^{-1}), foi utilizado o coeficiente de extinção de $1,35 \text{ mg}^{-1} \text{ mL cm}^{-1}$.

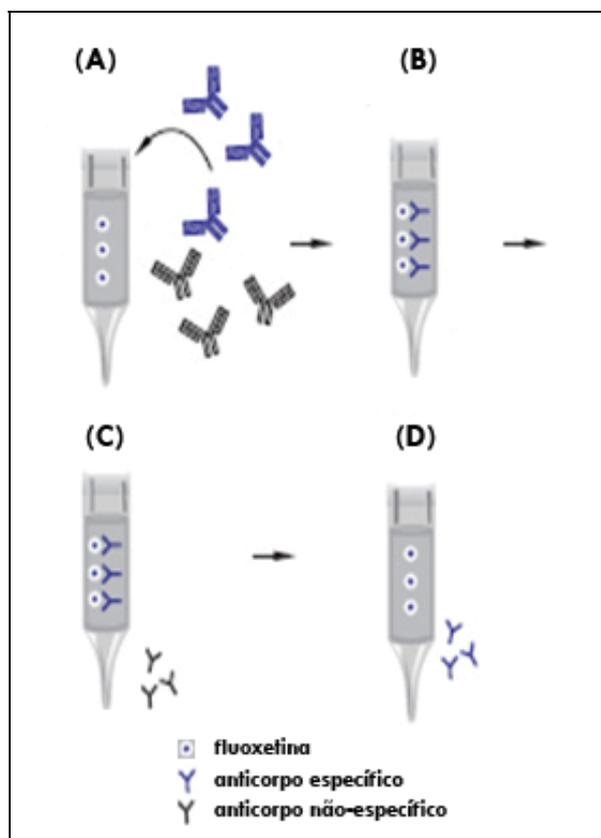


Figura 2.10 Esquema da purificação dos anticorpos anti-fluoxetina através das colunas de afinidade *labmade*. (A) Adição da solução de soro previamente purificado por precipitação por sulfato de amônio; (B) ligação dos anticorpos específicos à fluoxetina; (C) lavagem dos anticorpos não-específicos e (D) eluição dos anticorpos específicos anti-fluoxetina.

3.6.4 Avaliação da eficiência da coluna de afinidade *labmade* e especificidade dos anticorpos purificados

Para a avaliação da coluna de afinidade mais eficiente para o processo de purificação, os anticorpos específicos provenientes das duas resinas (Sephacrose- ϵ AC-FLX e Sepharose-BSA-FLX) foram imobilizados em CH-Sepharose ativada por NHS (coluna preparada de

forma análoga aos itens 3.6.2.1 e 3.6.2.2). Amostra de plasma branco de referência enriquecida com solução padrão de fluoxetina (50 ng mL^{-1}) foi adicionada nas diferentes colunas de imunoafinidade ($500 \mu\text{L}$). A eluição foi realizada com metanol 100% ($200 \mu\text{L}$). Os eluatos foram coletados em tubos eppendorf[®] e secos sob fluxo de N_2 . Os extratos foram ressuspensos em fase móvel (acetonitrila/ tampão fosfato 50 mmol L^{-1} pH 3,5; 60:40; v/v) e injetados no sistema cromatográfico.

3.7 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido com detector de fluorescência (UFLC Shimadzu LC-20 AT, detector de fluorescência RF-10AxL e interface CBM-20A). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram obtidos através da análise da solução padrão de fluoxetina em metanol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) no Espectrofluorímetro HITACHI F-4500. A otimização das condições cromatográficas LC-FD foram realizadas com soluções padrão de fluoxetina, em uma coluna Lichrospher[®] 60 RP - select B ($5 \mu\text{m}$, $25 \text{ cm} \times 4 \text{ mm}$), com pré-coluna similar LiChroCART^{®4-4} (MERCK). A fase móvel otimizada foi acetonitrila e tampão fosfato 50 mmol L^{-1} pH 3,5 (60:40, v/v), vazão de 1 mL min^{-1} , à temperatura ambiente no modo isocrático.

3.8 Desenvolvimento das barras SBSE imunosorvente

Para o preparo das barras SBSE *labmade*, hastes de ferro foram revestidas com tubos de vidro. As extremidades destes tubos foram fechadas com aquecimento (maçarico). Foram preparadas trinta barras SBSE com diferentes áreas ($1,2$; $2,4$ e $4,0 \text{ cm}^2$), dez barras para cada dimensão, conforme ilustradas na **Figura 2.11**.

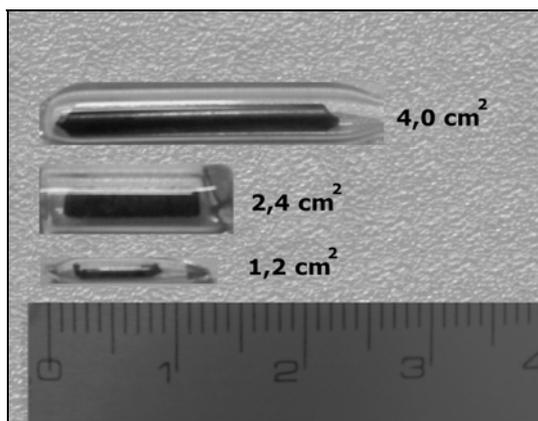


Figura 2.11 Barras SBSE (imunosorvente) representativas para cada área (1,2; 2,4 e 4,0 cm²).

3.9 Imobilização dos anticorpos anti-fluoxetina na superfície das barras SBSE

As barras SBSE foram lavadas extensivamente com solução de peróxido de hidrogênio 30% e ácido sulfúrico concentrado (30:70, v/v) por 1 h e posteriormente, com água ultrapura e etanol absoluto. Após esta etapa de limpeza, as barras foram silanizadas através da imersão em solução de 3- APTES etanólico (5% de 3-APTES, 5 % de água deionizada, 90 % de etanol absoluto) por 24 h à temperatura ambiente, lavadas com água e etanol absoluto, colocadas em estufa a vácuo a 80°C por 15 h e, ativadas através da imersão em solução de glutaraldeído 2,5% em PBS por 6 h.

Após a lavagem extensiva com água ultrapura, as barras SBSE foram imersas em solução 0,6 mg mL⁻¹ de anticorpos anti-fluoxetina em tampão PBS, sob agitação constante e branda, *overnight*. Os grupos ativos remanescentes do glutaraldeído na superfície das barras SBSE foram desativados com solução de etanolamina 0,3 mol L⁻¹ pH 7,5 por 2h. Após a desativação, as barras SBSE foram mantidas em solução PBS a 4°C.

Um método alternativo para a ativação das superfícies das barras SBSE foi também avaliado com o uso de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) da seguinte forma: as barras SBSE previamente silanizadas foram succiniladas (50 mg de anidrido succínico+hidróxido de sódio

0,5 mol L⁻¹, pH 9), lavadas com água ultrapura e em seguida, imersas em solução de NHS, na presença de EDAC 0,1 mol L⁻¹, pH 5,0.

3.10 Microscopia Eletrônica de Varredura

As modificações morfológicas ocorridas nas superfícies das barras SBSE (sem tratamento, processo de ativação, acoplamento e imobilização) foram avaliadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Inicialmente, as amostras (barras SBSE) foram montadas sobre porta-amostra em alumínio e, recobertas com ouro, por um período de 100 segundos, em um equipamento Bal-Tec mod. SCD-050 Sputter Coater. Subsequentemente, as amostras foram analisadas por MEV (equipamento Zeiss mod. EVO50).

3.11 Avaliação da superfície da barra SBSE funcionalizada

Um ensaio complementar à análise da modificação da superfície por MEV foi realizado para comprovar a funcionalização da superfície vítrea da barra de agitação com os reagentes 3-APTES e glutaraldeído.

Este procedimento consistiu na imobilização de enzima peroxidase (HRP) nas mesmas condições usadas para SBSE com anticorpos (conforme descrito no **item 3.9**). Após, a imobilização da enzima peroxidase, foi adicionado substrato cromogênico (OPD), dissolvido em metanol, na presença de H₂O₂. Caso a enzima estivesse ligada covalentemente à superfície ativada da barra, o produto da reação enzima-substrato deveria apresentar mudança de coloração.

3.12 Otimização do processo de SBSE com a fase imunosorvente

As variáveis do processo SBSE com a fase imunosorvente foram otimizadas para a obtenção de processo de extração eficiente em menor tempo de análise. Foram avaliados o volume de tampão PBS, o tempo de extração e a velocidade de agitação da barra SBSE. O pH do tampão foi mantido constante em 7,4.

Em um tubo de 5 mL com tampa rosca, 4 mL de solução tampão PBS foram adicionados a 1,0 mL de amostra de plasma enriquecida com solução padrão de fluoxetina (500 ng mL^{-1}). A barra SBSE foi imersa na amostra e a extração foi realizada sob agitação magnética a 625 rpm, em diferentes tempos de extração (10 a 50 min) para estabelecer o equilíbrio de sorção. Após a extração, a barra SBSE foi removida cuidadosamente e lavada com solução tampão PBS pH 7,4.

Para a etapa de dessorção, a barra SBSE previamente lavada foi colocada em um frasco cônico de vidro contendo metanol com volume adequado para total imersão. A dessorção líquida foi realizada em banho ultrassom em diferentes intervalos de tempo (5 a 25 min) à temperatura ambiente. Tomou-se o cuidado para que não houvesse aquecimento durante o processo de dessorção (controle de temperatura no banho de ultrassom).

Após a dessorção, o extrato metanólico foi seco sob fluxo de N_2 . O extrato seco foi ressuspenso em 200 μL de fase móvel (previamente otimizada) e 20 μL deste extrato foram injetados no sistema LC-FD.

3.13 Validação Analítica

Os métodos analíticos empregados para quantificação de fármacos e seus produtos de biotransformação têm sido empregados para diferentes fins, tais como, monitorização terapêutica, estudos de biodisponibilidade e toxicocinética [122].

A validação analítica do método padronizado tem sido realizada para assegurar a confiabilidade dos resultados apresentados.

No Brasil, as agências normativas que estabelecem critérios para a validação analítica têm sido a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) e o Ministério da Agricultura [122-124].

3.13.1 Linearidade

A linearidade dos métodos SBSE/LC-FD de imunoafinidade desenvolvidos foi avaliada através das amostras de plasma branco de referência enriquecidas com solução de fluoxetina em dez diferentes concentrações: limite de quantificação, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 300, 500 e 1000 ng mL⁻¹.

Cada ponto da curva foi avaliado em quintuplicata, sendo o valor médio e seus respectivos desvios considerados para construção da curva analítica.

3.13.2 Precisão interensaio

A precisão interensaio representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio.

A repetibilidade do método deve ser determinada em um mesmo dia (precisão intraensaio) e em dias diferentes (precisão interensaio). A precisão deve ser expressa pelo coeficiente de variação (CV), não se admitindo valores superiores a 15% para fluidos biológicos.

Portanto, neste trabalho, a precisão interensaio foi estimada através do coeficiente de variação (%) das concentrações da fluoxetina obtidas a partir da curva analítica. Foram realizadas cinco extrações em dias consecutivos em diferentes níveis de concentrações.

O coeficiente de variação foi calculado de acordo com a **Equação 4**:

$$CV(\%) = \frac{\rho}{\bar{X}} \cdot 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

ρ representa o desvio padrão das medidas;

\bar{X} representa a concentração média determinada.

3.13.3 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência.

A ANVISA preconiza que a exatidão deve ser estimada em três níveis de concentração (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação do método, realizando-se, no mínimo cinco determinações por analito. O desvio não deve exceder 15% exceto para o LOQ, para o qual se admitem valores menores ou iguais a 20%.

Desta forma, os valores de áreas obtidos para a fluoxetina no cálculo da precisão interensaio foram utilizados para cálculo da exatidão, empregando-se a **Equação 5**.

$$Exatidão(\%) = \frac{\bar{X}}{CT} \cdot 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

\bar{X} representa a concentração média determinada para o analito com base na curva analítica e; CT representa a concentração teórica (concentração adicionada).

3.13.4 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LOQ) foi determinado através de extrações de amostras de plasma branco enriquecidas com soluções em concentrações decrescentes de fluoxetina (1000 a 5 ng mL⁻¹).

Os critérios adotados para estabelecer o limite de quantificação foram o sinal analítico do fármaco dez vezes maior que o ruído da linha de base do cromatograma e coeficiente de variação inferior a 20%.

3.13.5 Seletividade e Especificidade

A seletividade dos métodos propostos foi avaliada através de extrações de diferentes amostras de plasma branco de referência (sem adição do fármaco) e; amostras de plasma branco de referência enriquecidas com solução padrão de fluoxetina.

A especificidade dos métodos foi avaliada através de extrações das amostras de plasma branco de referência enriquecidas com diferentes fármacos (100 ng mL⁻¹), que podem ser coadministrados durante o tratamento com o antidepressivo fluoxetina.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise de fluoxetina no espectrofluorímetro 3-D

Fez-se uma varredura de uma solução padrão de fluoxetina em metanol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) no espectrofluorímetro 3-D (Hitachi F-4500), excitando-se a molécula de 200 a 260 nm e, obtendo-se desta forma, a maior intensidade de fluorescência em 230 nm de excitação com 290 nm de emissão conforme demonstrado na **Figura 2.12**.

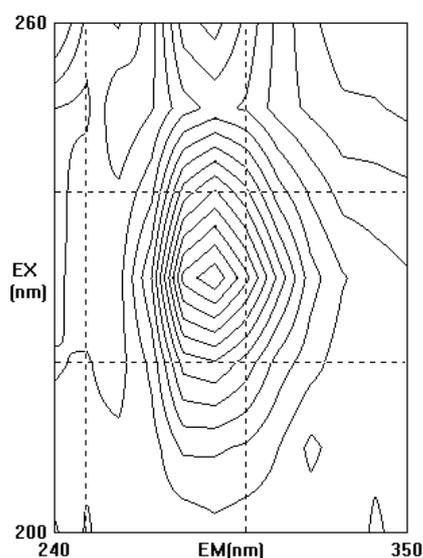


Figura 2.12 Espectro de fluorescência de uma solução padrão de fluoxetina ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Transpondo estes resultados para o software Origin 8.0 a fim de se visualizar de forma mais nítida os comprimentos de onda de excitação (λ_{exc}) e emissão (λ_{em}), obteve-se o gráfico ilustrado na **Figura 2.13**.

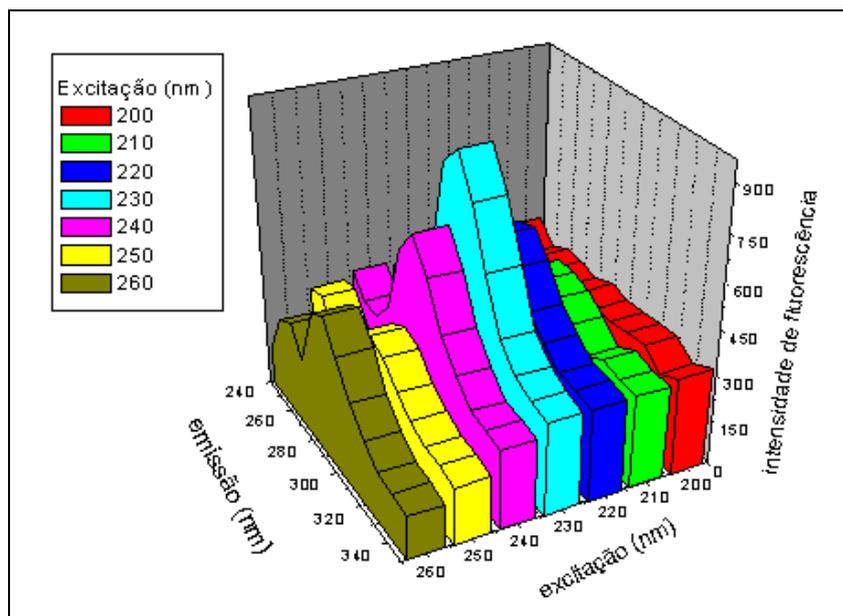


Figura 2.13 Espectro de fluorescência de uma solução padrão de fluoxetina ($1\mu\text{g mL}^{-1}$), plotado no programa de computador (Origin 8.0).

4.2 Preparo do imunógeno e imunização dos coelhos

O fármaco fluoxetina isoladamente mostra-se incapaz de estimular o sistema imune para produzir anticorpos. Desta forma, a molécula tornou-se imunogênica a partir da conjugação com soroalbumina bovina (conjugado BSA-fluoxetina), o que resultou na produção de anticorpos anti-fluoxetina altamente específicos, cujos resultados são discutidos a seguir.

4.3 Detecção e atividade dos anticorpos anti-fluoxetina

Com os resultados da placa de ELISA (**Figura 2.14**), obteve-se êxito na detecção dos anticorpos anti-fluoxetina. Com este resultado, além da especificidade comprovada também foi verificada a atividade dos anticorpos até a diluição 1:32 (anticorpo:tampão fosfato; v/v). Realizou-se o mesmo procedimento para a detecção dos anticorpos monoclonais anti-fluoxetina.

Nas **colunas 2 e 4**, onde foram incubados anticorpos não específicos para fluoxetina (nomeadamente *anticorpos normais*) e na **coluna 4**, solução de leite desnatado 5% respectivamente, o resultado foi negativo, pois não havia incubação de anticorpos específicos anti-fluoxetina. Nas **colunas 1, 3 e 5**, o resultado positivo (coloração amarela) evidenciou a interação entre fluoxetina (antígeno) e o anticorpo correspondente.

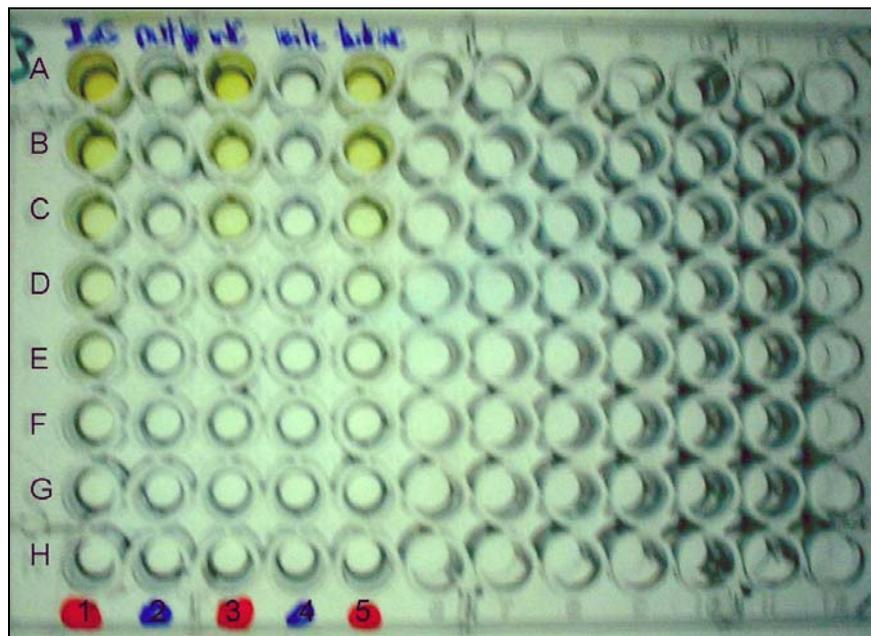


Figura 2.14 Foto da placa de ELISA revestida com OVA-fluoxetina: resultados positivos confirmando a especificidade bem como a atividade dos anticorpos anti-fluoxetina frente ao antígeno (**colunas 1, 3 e 5**) e resultados negativos, ausência de especificidade (**colunas 2 e 4**).

4.4 Purificação e dosagem dos anticorpos específicos anti-fluoxetina

Para o procedimento de purificação dos anticorpos, foram avaliadas 2 colunas: Seph-BSA-fluoxetina e Seph- ϵ AC-fluoxetina. Os eluatos das duas colunas foram avaliados por *dot* em membrana de nitrocelulose (**Figura 2.15**), através do qual, verificou-se as frações que continham os anticorpos.

Posteriormente, foram desenvolvidas duas resinas imunoabsorventes com os anticorpos purificados através das colunas de afinidade (Seph-BSA-fluoxetina e Seph- ϵ AC-fluoxetina), os quais foram ligados à CH-Sepharose ativada por NHS.

A coluna imunoabsorvente que continha os anticorpos purificados pela Seph- ϵ AC-FLX apresentou maior eficiência (**Figura 2.16B**) na extração de fluoxetina. Esta análise (SPE de imunoafinidade/LC-FD) do extrato, possibilitou a confirmação da especificidade dos anticorpos anti-fluoxetina produzidos em nosso laboratório, bem como, forneceu informações da quantidade extraída do fármaco.

Desta forma, para os ensaios subsequentes de purificação de anticorpos anti-fluoxetina (soro bruto), foi utilizada a coluna de afinidade Seph- ϵ AC-fluoxetina.

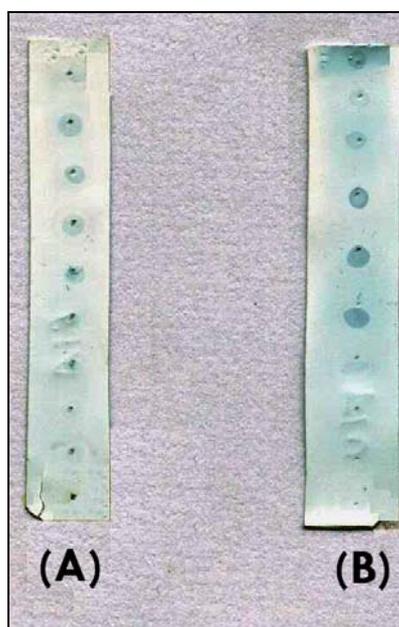


Figura 2.15 Dot em membrana de nitrocelulose com 5 μ L de cada fração eluída das diferentes sepharoses: (A) Seph-BSA-fluoxetina e (B) Seph- ϵ AC-fluoxetina.

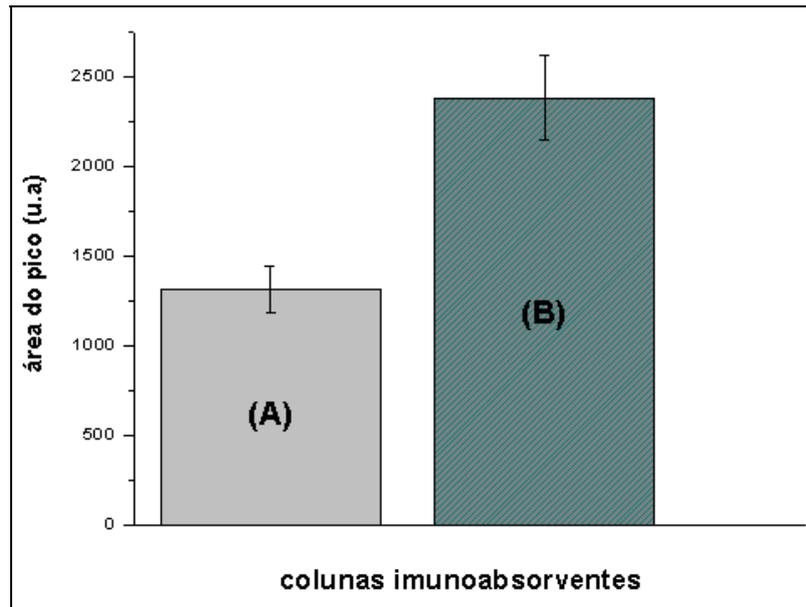


Figura 2.16 Avaliação da eficiência das colunas imunoabsorventes através da análise SPE de imunoafinidade/LC-FD de amostras de plasma branco enriquecidas com solução padrão de fluoxetina (50 ng mL^{-1}): **(A)** coluna imunoabsorvente com anticorpos purificados pela Seph-BSA-fluoxetina e **(B)** coluna imunoabsorvente com anticorpos purificados Seph- ϵ AC-fluoxetina.

As frações provenientes da purificação por coluna de afinidade foram submetidas à espectrofotometria UV-VIS (280 nm), as quais resultaram em valores de concentração que variaram de $0,52$ a $8,9 \text{ mg mL}^{-1}$ (concentração de anticorpo purificado em mg/ mL de tampão fosfato).

4.5 Titulação do líquido ascítico dos clones anti-fluoxetina

Esta etapa do trabalho (produção dos anticorpos monoclonais anti-fluoxetina) foi realizada em parceria com o Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A titulação dos clones do líquido ascítico foi realizada por ELISA (**Figura 2.17**). As diluições das soluções foram de 1:200 a 1:6400 (v/v). De acordo com a **Figura 2.17C**, o clone

F5 apresentou os maiores valores de absorção, o qual, portanto, foi selecionado para a etapa de imobilização de anticorpos monoclonais na superfície vítrea da barra SBSE.

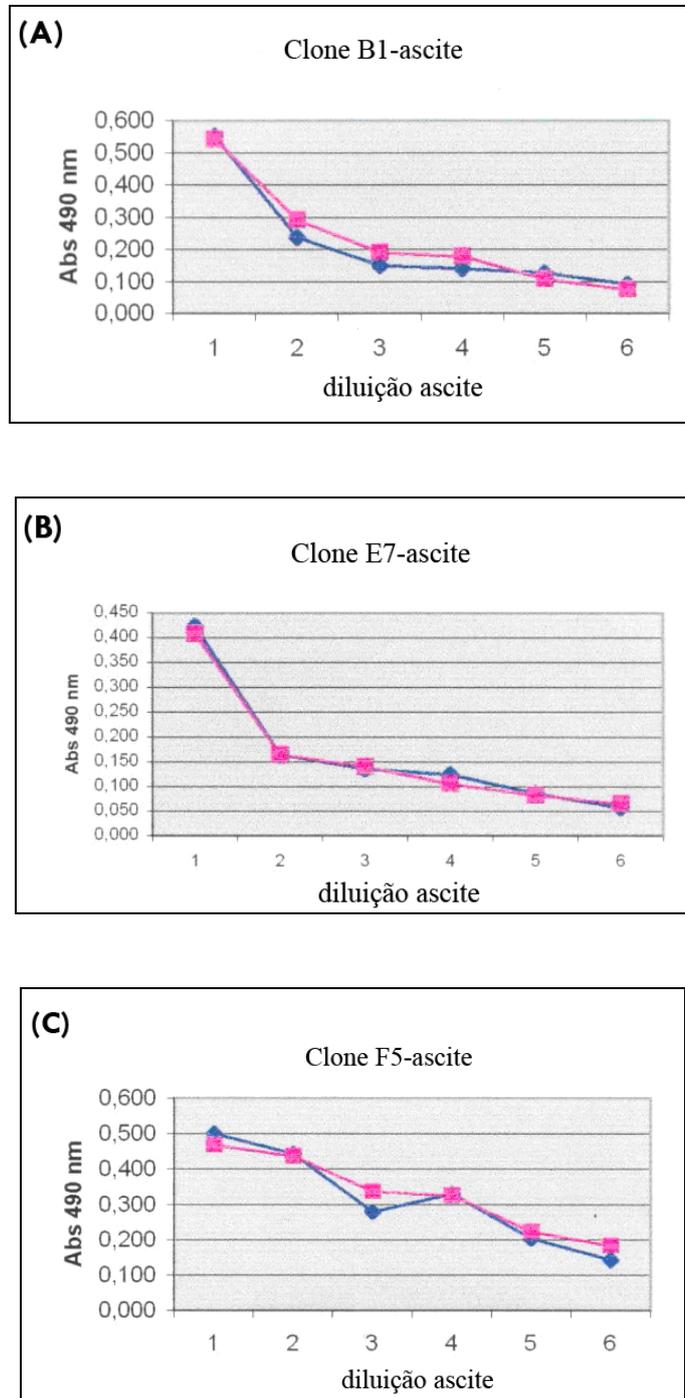


Figura 2. 17 Titulação do líquido ascítico dos clones anti-fluoxetina (ELISA): **(A)** clone B1; **(B)** clone E7 e **(C)** clone F5.

4.6 Desenvolvimento da barra SBSE imunosorvente

Inicialmente, a superfície vítrea da barra SBSE foi silanizada com 3-APTES, produzindo grupos aminos primários (**Figura 2.18a**). Subsequentemente, a adição de glutaraldeído permitiu que grupos aldeídos fossem introduzidos na superfície da barra SBSE (**Figura 2.18b**). Finalmente, os anticorpos anti-fluoxetina previamente purificados foram ligados à superfície da barra SBSE através dos grupos aminos da proteína via mecanismo de adição tipo Michael (**Figura 2.18c**).

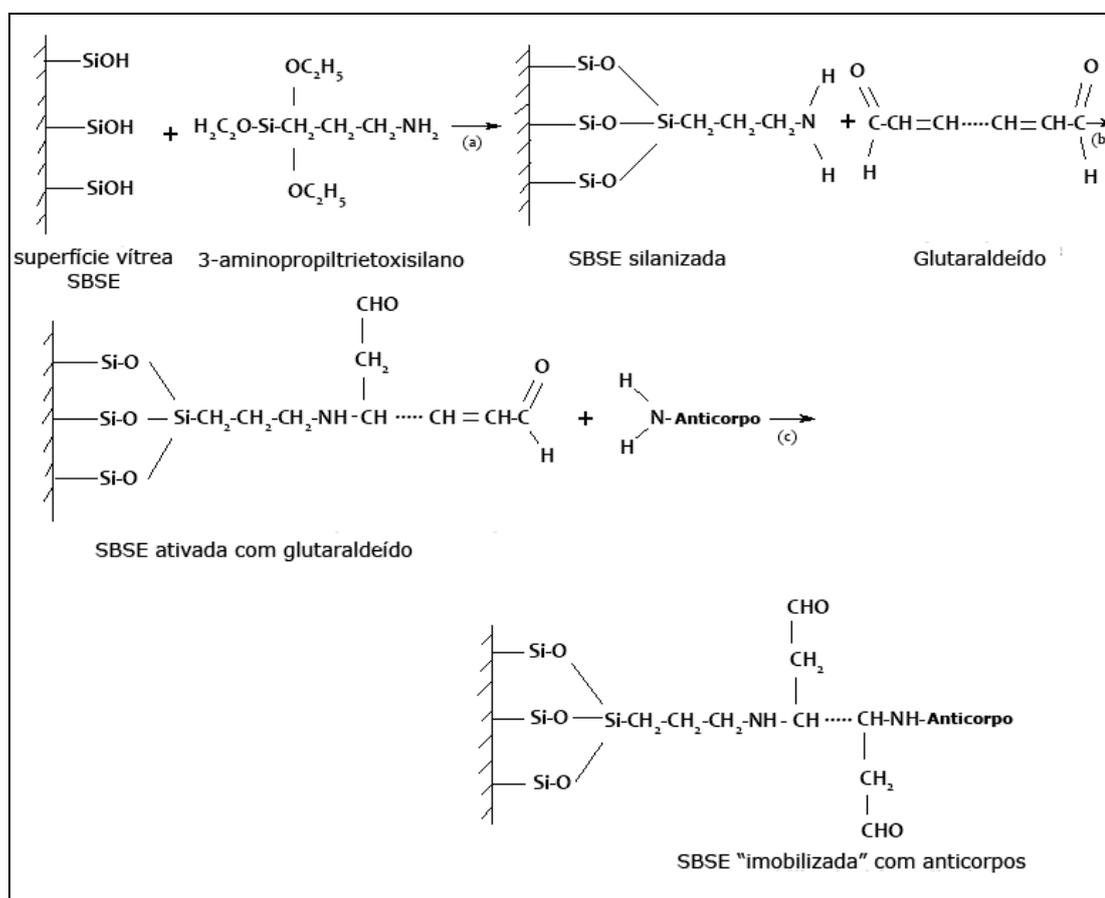


Figura 2.18 Reações envolvidas na imobilização dos anticorpos anti-fluoxetina na superfície da barra SBSE: **(a)** silanização da superfície SBSE com 3-APTES; **(b)** ativação da superfície SBSE com glutaraldeído e **(c)** imobilização dos anticorpos.

4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os micrográficos de varredura eletrônica da superfície vítrea das barras SBSE, bem como as superfícies ativadas, antes e após a imobilização dos anticorpos anti-fluoxetina estão ilustrados na **Figura 2.19**. As imagens indicam as modificações em relação à morfologia e porosidade das barras SBSE em cada etapa do processo de imobilização dos anticorpos.

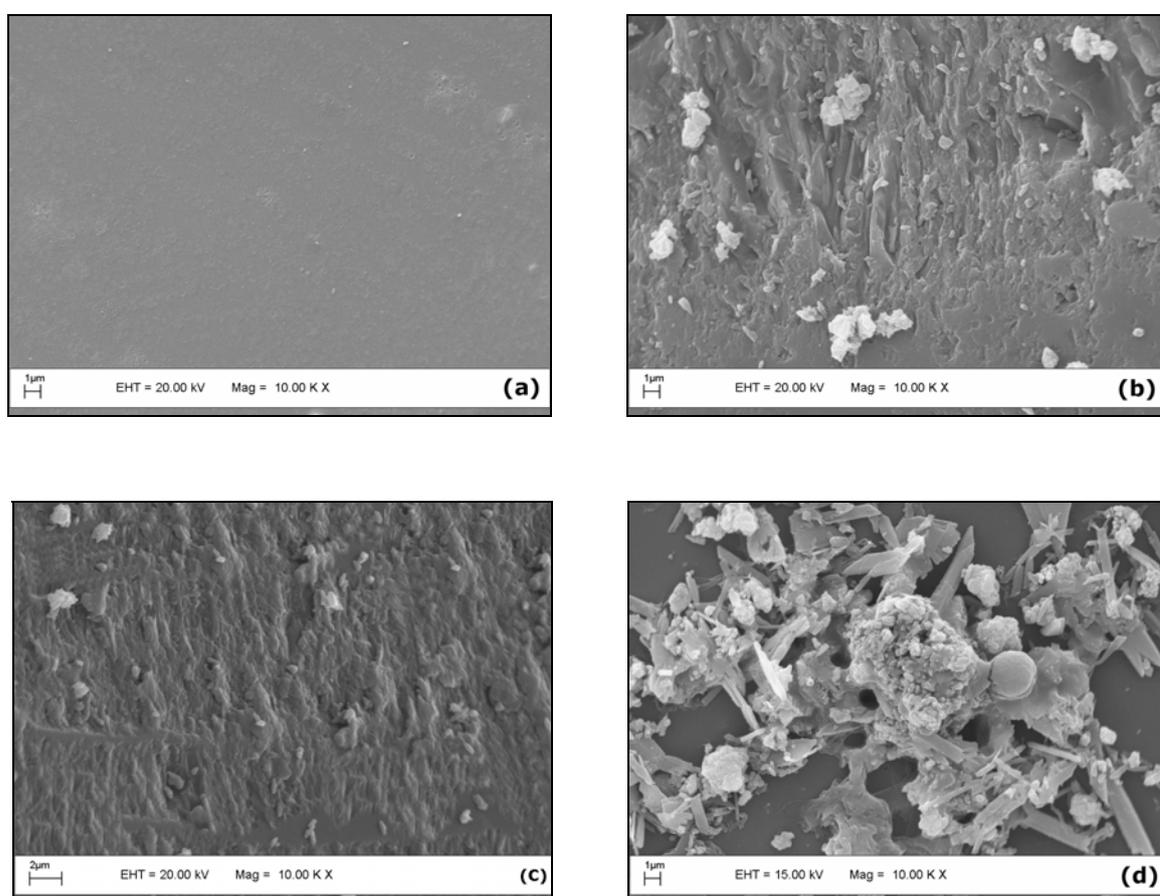


Figura 2.19 Imagens da microscopia eletrônica de varredura de: **(a)** superfície da barra SBSE sem tratamento prévio; **(b)** superfície SBSE silanizada; **(c)** superfície SBSE ativada com glutaraldeído e **(d)** superfície SBSE revestida com anticorpos anti-fluoxetina.

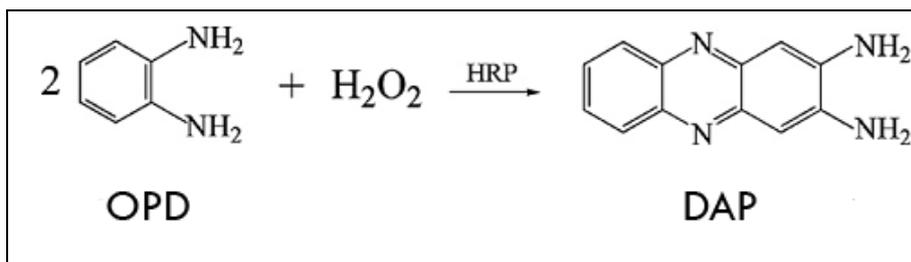
4.8 Avaliação da superfície da barra funcionalizada

Com a imobilização da enzima peroxidase (posterior adição de OPD), foi possível comprovar que a superfície da barra foi modificada pelos reagentes 3-APTES e glutaraldeído.

A barra controle (funcionalizada apenas com 3-APTES; sem glutaraldeído) não apresentou mudança de coloração quando o OPD foi adicionado. A barra funcionalizada com 3-APTES e glutaraldeído apresentou mudança na coloração com a adição de OPD (transparente para amarelo-amarronzado), mostrando que a superfície da barra SBSE foi derivatizada com sucesso, permitindo, portanto, um método eficiente de imobilização de biomoléculas (**Figura 2.20**). O **Esquema 1** ilustra a reação que ocorreu entre a enzima e o substrato cromogênico, cujo produto 2,3-diaminofenazina (DAP) possui coloração amarelo-amarronzado.



Figura 2.20 Funcionalização das barras SBSE: (A) superfície funcionalizada com 3-APTES e (B) superfície funcionalizada com 3-APTES e glutaraldeído.



Esquema 1: Reação entre enzima HRP e OPD na presença de H_2O_2 , gerando DAP (coloração amarelo-amarronzado).

4.9 Avaliação de diferentes reagentes no processo de imobilização

As superfícies das barras SBSE ativadas com glutaraldeído resultaram em análises SBSE/LC com maiores valores de área do pico (u.a) quando comparadas às barras SBSE ativadas com NHS (**Figura 2.21**). Além disso, o procedimento de imobilização com glutaraldeído também apresentou menor número de etapas bem como menor tempo de execução.

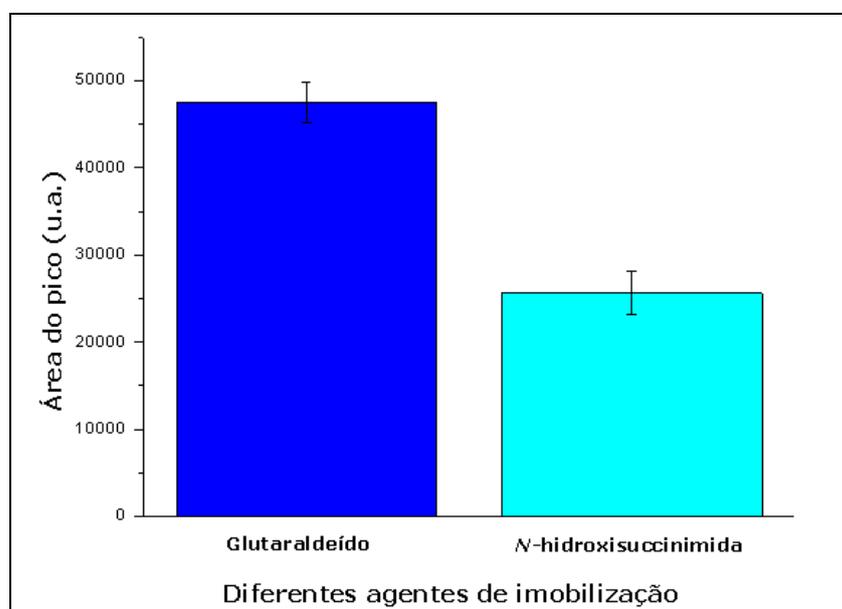


Figura 2.21 Análises SBSE imunosorvente/LC-FD de amostras de plasma branco enriquecidas com solução padrão de fluoxetina na concentração de 100 ng mL^{-1} . Foram avaliados glutaraldeído e NHS como agentes de imobilização dos anticorpos anti-fluoxetina, na superfície da barra SBSE, previamente funcionalizada com 3-APTES.

4.10 Avaliação da área superficial da barra SBSE imunosorvente

As barras SBSE com área de $4,0 \text{ cm}^2$ (maior superfície imunosorvente) apresentaram maiores valores de área do pico, que foram obtidos através do método SBSE /LC-FD de imunoafinidade, para análise de amostras de plasma branco enriquecidas com solução padrão de fluoxetina na concentração de 100 ng mL^{-1} (**Figura 2.22**). Portanto, os ensaios subsequentes foram realizados com barras SBSE de maior área ativadas com glutaraldeído.

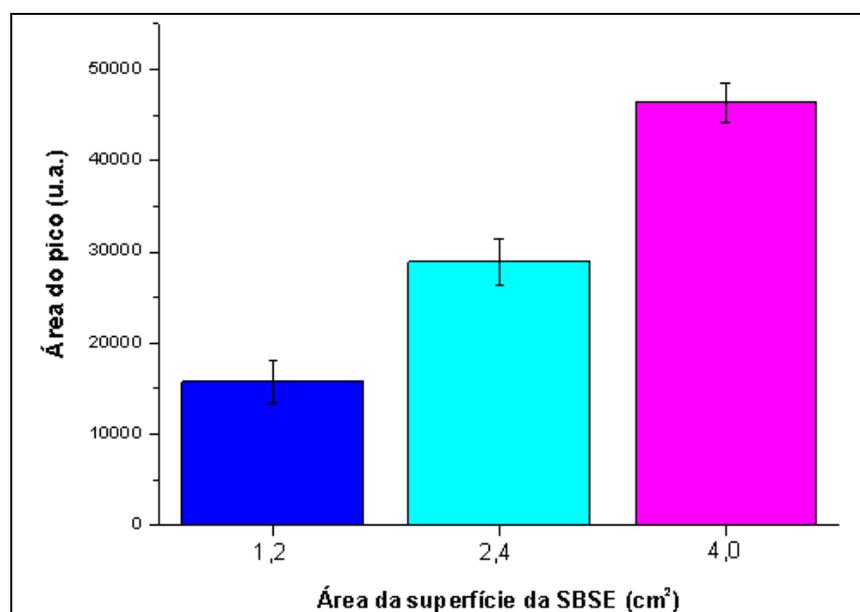


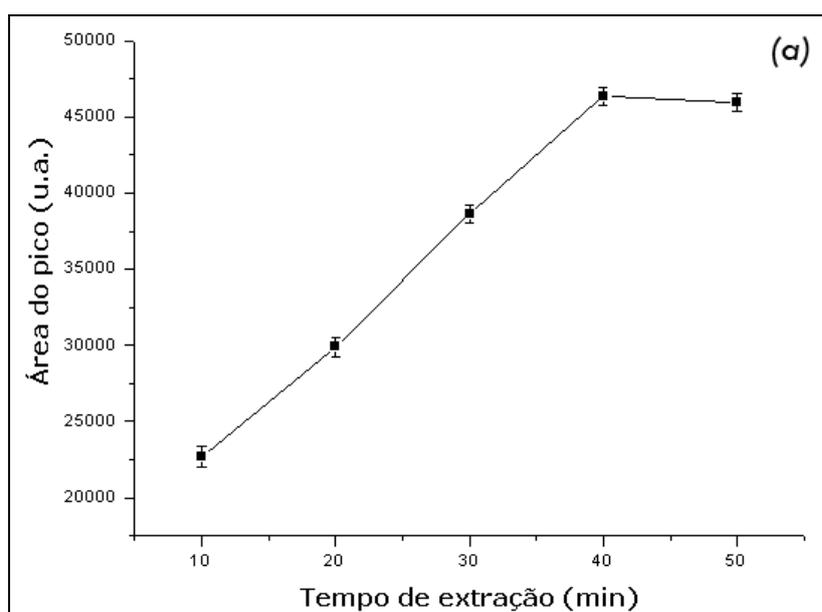
Figura 2.22 Análises SBSE imunosorvente/LC-FD de amostras de plasma branco de referência enriquecidas com solução padrão de fluoxetina na concentração de 100 ng mL^{-1} , utilizando barras SBSE de diferentes dimensões (1,2; 2,4 e $4,0 \text{ cm}^2$).

4.11 Otimização das variáveis do processo SBSE de imunoafinidade

As variáveis do processo SBSE de imunoafinidade, tanto as condições de extração quanto as de dessorção foram otimizadas para estabelecer o equilíbrio de sorção antígeno-anticorpo em um menor tempo de análise e obtenção de limite de quantificação adequado à monitorização terapêutica (intervalo terapêutico).

O volume de amostra de plasma e a velocidade de agitação da barra SBSE foram mantidos constantes durante a otimização. A velocidade de agitação otimizada foi a máxima conseguida sem que houvesse contato mecânico da barra SBSE com o frasco de extração, a qual foi estabelecida em 625 rpm. Quanto ao volume de tampão PBS, foram avaliados os volumes 3, 4 e 5 mL, sendo que o volume de 4 mL foi o escolhido, pois possibilitou uma agitação mais eficaz com a barra de 4 cm², conseqüentemente, o equilíbrio pode ser alcançado mais rapidamente. O pH do tampão PBS foi mantido em 7,4; uma vez que o pH deve ser neutro devido à presença dos anticorpos. Além disso, o tampão neste pH permite que ocorra eficientemente a ligação entre antígeno-anticorpo.

Segundo os resultados obtidos (**Figura 2.23**), os tempos de extração e dessorção foram estabelecidos em 40 e 20 min, respectivamente. Não foi observado efeito de memória (*carryover*) após o processo de dessorção, fato comprovado pela análise de uma amostra de plasma branco de referência. As barras SBSE foram submetidas à etapa de lavagem, entre as extrações, com solução tampão PBS e metanol (50:50- v/v) por 10 min, sob agitação.



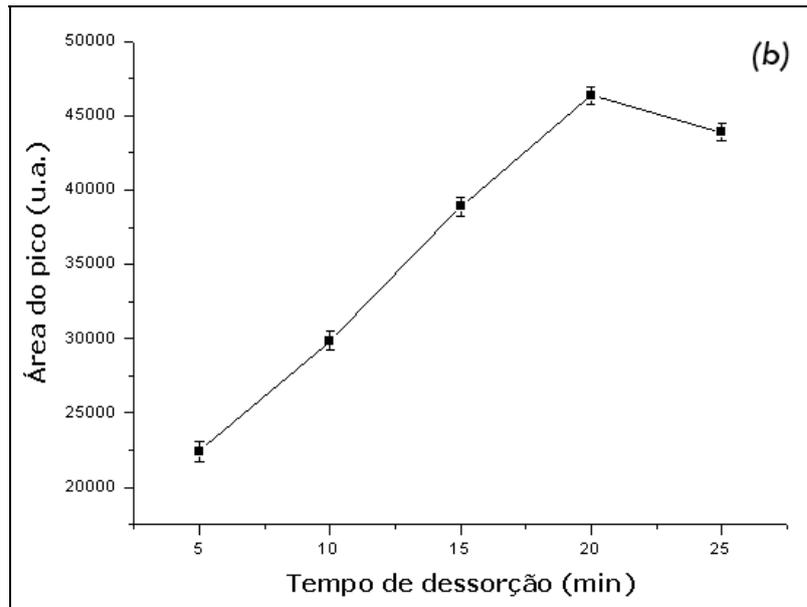


Figura 2. 23 Otimização das variáveis do processo SBSE de imunoafinidade: (a) extração e (b) desorção.

4.12 Avaliação das capacidades adsorptivas das barras SBSE imunosorventes desenvolvidas

As capacidades adsorptivas das barras imunosorventes (barras SBSE - 4 cm²) foram determinadas através da massa extraída de fluoxetina *versus* concentração na amostra de plasma (**Figura 2.24**). Com o uso do programa de computador Gráfit 3.0, através da equação da hipérbole, a quantidade máxima extraída de fluoxetina foi estimada em 62 pmol, para os anticorpos policlonais; e 433 pmol, para os anticorpos monoclonais. Assumindo a proporção de 1 mol de fluoxetina para 1 mol de sítio antigênico ligante, na total saturação do imunosorvente, a concentração molar de fluoxetina equivale a 31 e 216,5 pmol de anticorpo bivalente ligado à fase, o que corresponde a 1,2 e 8 µg de anticorpos policlonais e monoclonais anti-fluoxetina por cm², respectivamente. Estes valores obtidos são condizentes com os descritos na literatura [125-129].

A capacidade adsortiva maior, obtida com o imunosorvente de anticorpo monoclonal, permitiu uma maior faixa linear, a qual é de extrema relevância para a análise quantitativa do método analítico.

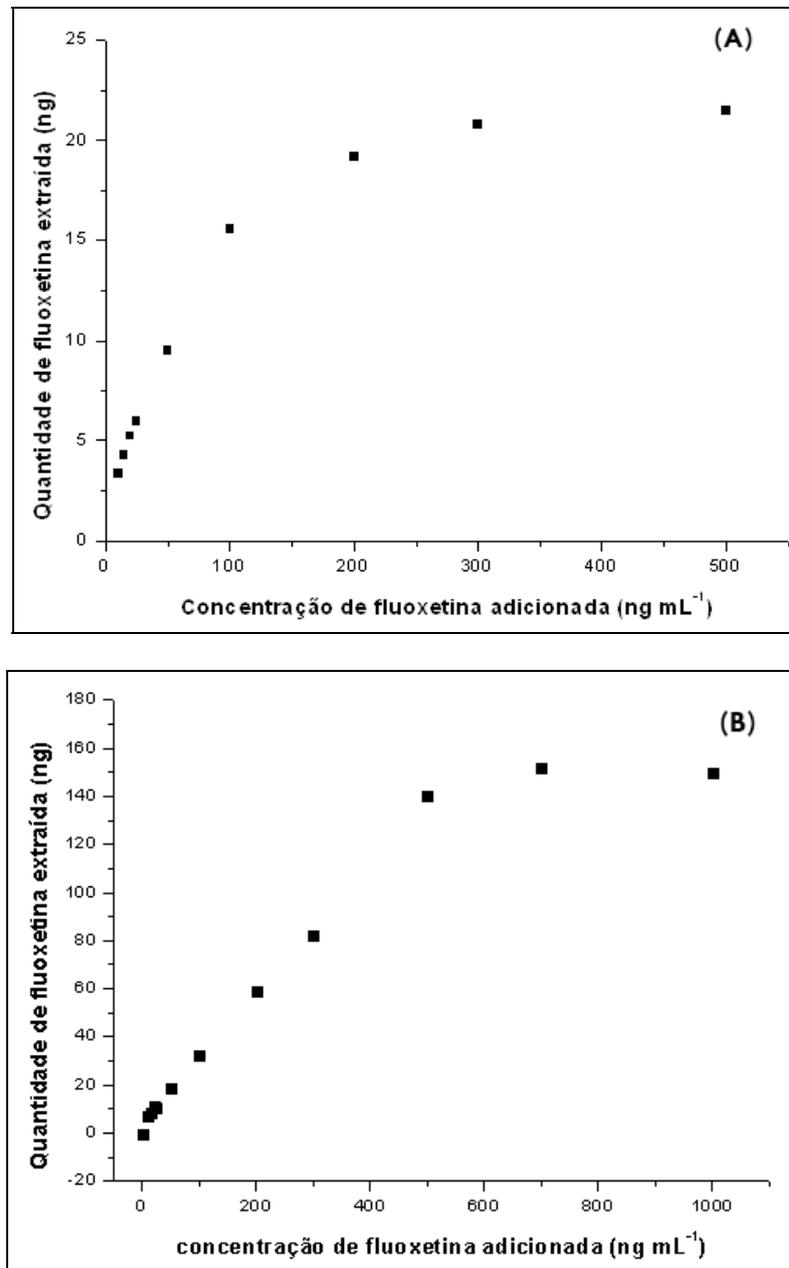


Figura 2.24 Avaliação das capacidades adsortivas das barras SBSE imunosorventes através das análises SBSE/LC-FD de amostras de plasma branco enriquecidas com solução padrão de fluoxetina em diferentes concentrações: **(A)** anticorpos policlonais e **(B)** anticorpos monoclonais.

4.13 Validação Analítica

Neste trabalho, a validação analítica foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pela agência regulamentadora, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Resolução RE nº 899) [123], para análise de fármacos em fluidos biológicos.

Todos os parâmetros avaliados durante a validação analítica (especificidade, seletividade, linearidade, limite de quantificação, exatidão e precisão) foram realizados empregando-se o método da padronização externa.

4.13.1 Linearidade

A linearidade dos métodos SBSE/LC-FD de imunoafinidade desenvolvidos foi determinada com amostras de plasma branco de referência enriquecidas com solução padrão de fluoxetina em diferentes concentrações. O intervalo de 10 a 100 ng mL⁻¹ foi linear ($y = 2,42 + 0,133x$), com coeficiente de determinação maior que 0,997, para a barra SBSE imobilizada com os anticorpos policlonais; e de 10 a 500 ng mL⁻¹ ($y = 4,06 + 0,269x$) com coeficiente de determinação maior do que 0,998 para a barra SBSE imobilizada com os anticorpos monoclonais.

Cada ponto da curva foi avaliado em quintuplicata, sendo o valor médio e seus respectivos desvios considerados para construção da curva analítica. Os coeficientes de variação (CV) para os pontos da curva de calibração foram menores que 10%, os quais são condizentes com as normas preconizadas pela ANVISA.

4.13.2 Limite de Quantificação

O limite de quantificação de 10 ng mL⁻¹ dos métodos desenvolvidos apresentou coeficiente de variação menor que 8%.

4.13.3 Precisão interensaio e exatidão

A precisão interensaio dos métodos SBSE/LC-FD de imunoafinidade foi determinada através das análises em replicatas ($n=5$) de amostras de plasma branco enriquecidas com solução padrão de fluoxetina em seis diferentes concentrações. Os valores de CV obtidos foram menores do que 9%.

A exatidão foi determinada através da razão entre as concentrações de fluoxetina obtidas pela curva analítica após as análises SBSE/LC-FD de imunoafinidade (amostras de plasma branco de referência enriquecidas com soluções padrão de fluoxetina) e as concentrações adicionadas às amostras.

A **Tabela 2.4** sumariza os valores obtidos nos parâmetros de validação acima descritos.

Tabela 2.4 Precisão interensaio (CV) e exatidão dos métodos SBSE/LC-FD ($n=5$).

Concentração adicionada de fluoxetina (ng mL ⁻¹)	Concentração determinada (ng mL ⁻¹) $\pm\sigma$		CV (%)		Exatidão (%)	
	Poli	Mono	Poli	Mono	Poli	Mono
10	9,50 \pm 0,70	10,7 \pm 0,82	7,4	7,7	95	107
15	14,4 \pm 1,10	15,2 \pm 1,25	7,6	8,2	96	101
20	21,8 \pm 1,42	21,4 \pm 1,58	6,5	7,4	109	107
25	26,0 \pm 1,86	24,8 \pm 1,73	7,1	6,9	104	99
50	48,9 \pm 2,48	49,6 \pm 2,22	5,1	4,5	98	99
100	98,6 \pm 3,25	98,8 \pm 2,96	3,3	3,0	99	99
200	-	196 \pm 4,94	-	2,5	-	98
300	-	297 \pm 4,85	-	1,6	-	99
500	-	496 \pm 5,35	-	1,1	-	99

σ : desvio padrão; CV: coeficiente de variação; **Poli**: anticorpo policlonal; **Mono**: anticorpo monoclonal.

4.13.4 Reprodutibilidade das barras SBSE com a fase imunosorvente

A reprodutibilidade dos resultados SBSE/LC-FD obtidos com cinco barras SBSE (imunosorvente) diferentes foi confirmada pelos coeficientes de variação menores que 12%. Estas análises foram realizadas com amostras de plasma branco de referência enriquecidas com solução padrão de fluoxetina na concentração de 100 ng mL^{-1} .

4.13.5 Estabilidade e robustez das barras SBSE com a fase imunosorvente

A estabilidade das barras SBSE (fase imunosorvente) em PBS (6°C) foi analisada num período de 8 meses, durante o qual, não ocorreram mudanças significativas na eficiência da extração. Este ensaio foi realizado através da comparação dos resultados das análises SBSE/LC-FD das amostras de plasma branco enriquecidas com solução padrão de fluoxetina (100 ng mL^{-1}) entre as barras SBSE previamente (diferentes intervalos de tempo) e recém-preparadas.

A robustez (reutilização) das barras SBSE foi confirmada até no máximo 30 extrações, com perda mínima de eficiência de extração.

4.13.6 Seletividade e especificidade dos métodos de imunoafinidade SBSE/LC-FD

A seletividade dos métodos SBSE/LC-FD de imunoafinidade desenvolvidos foi demonstrada pelos cromatogramas representativos da extração das amostras do plasma branco de referência e do plasma branco de referência enriquecido com solução padrão de fluoxetina no LOQ (**Figura 2.25**), os quais ilustram a capacidade do método em quantificar

inequivocamente fluoxetina na presença de compostos endógenos do plasma, ou seja, no tempo de retenção da fluoxetina não foram observados picos interferentes.

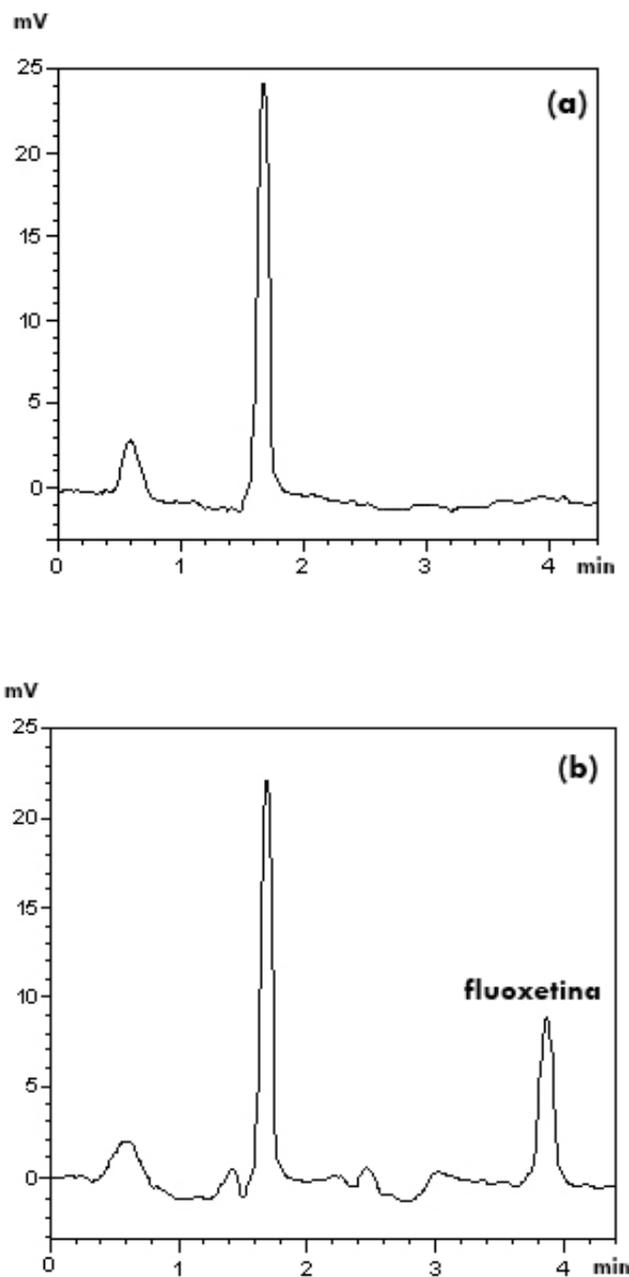


Figura 2.25 Cromatogramas representativos do método SBSE/LC-FD de imunoafinidade: **(a)** amostra de plasma branco de referência e **(b)** amostra de plasma branco enriquecido com solução padrão de fluoxetina na concentração de 10 ng mL^{-1} (LOQ).

A fluoxetina pode ser prescrita em combinação com diferentes agentes psicotrópicos e/ou outros fármacos. As soluções padrão de mirtazapina, paroxetina, citalopram, norfluoxetina, diazepam, fenobarbital, primidona, 4-metilprimidona, cocaína e moclobemida foram preparadas na concentração de 100 ng mL^{-1} e analisadas por SBSE/LC-FD, com seus respectivos comprimentos de onda de excitação e emissão. O imunosorvente SBSE apresentou reatividade cruzada apenas para a norfluoxetina. No entanto, o método SBSE/LC-FD não apresentou linearidade satisfatória para a determinação quantitativa de norfluoxetina em amostras de plasma.

Para as barras SBSE com anticorpos monoclonais, além de apresentarem menor reatividade cruzada com o metabólito (análise realizada com a mesma amostra de plasma de paciente e no mesmo dia), a linearidade do método, bem como a capacidade adsorptiva da barra, foram superiores aos valores obtidos com a SBSE imobilizada com anticorpos policlonais.

Contrastando com a especificidade da barra SBSE com a fase imunosorvente desenvolvida neste trabalho, a barra SBSE comercial, apresentou seletividade para a análise simultânea de vários antidepressivos em amostras de plasma [3,12].

4.14 Aplicação do método SBSE/LC-FD de imunoafinidade para fins de monitorização terapêutica

Para avaliar a eficiência do método desenvolvido para fins de monitorização terapêutica, o protocolo descrito foi aplicado na análise de amostras de plasma de seis diferentes pacientes idosos em terapia com fluoxetina. A menor e maior concentração determinadas foram 46 e 94 ng mL^{-1} , respectivamente. Conforme ilustrado na **Figura 2.26**, nas análises SBSE/LC-FD, o pico de norfluoxetina também foi identificado.

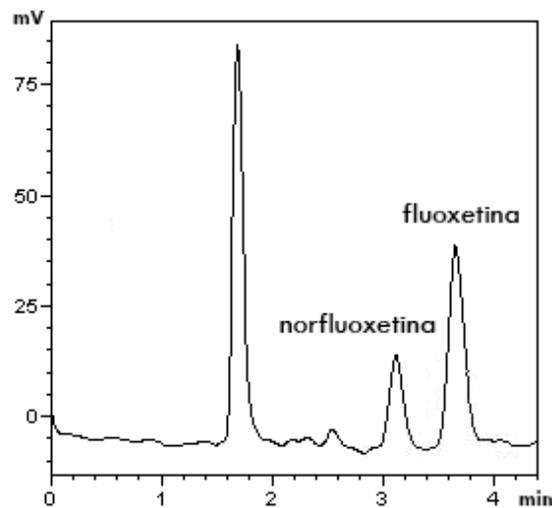


Figura 2.26 Cromatograma representativo de uma das amostras de plasma de pacientes idosos em terapia com Prozac[®]. A concentração de fluoxetina determinada foi de 94 ng mL⁻¹.

O método desenvolvido apresentou maior seletividade/especificidade analítica e menor LOQ (10 ng mL⁻¹) quando comparado aos métodos descritos na literatura, os quais utilizaram barra SBSE comercial (PDMS; LOQ= 25 ng mL⁻¹) [12] e barra SBSE mista (PDMS e polipirrol; LOQ= 30 ng mL⁻¹) [37].

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os anticorpos anti-fluoxetina obtidos neste trabalho, policlonais e monoclonais, apresentaram alta especificidade contra o antidepressivo fluoxetina, o que resultou em métodos SBSE/LC-FD com fases imunosorventes (imobilização de anticorpos poli e monoclonais) altamente específicos e seletivos para a determinação de fluoxetina em amostras de plasma.

Este trabalho mostrou que todos os parâmetros avaliados para o processo SBSE com anticorpos policlonais foram transpostos diretamente para o processo SBSE com anticorpos monoclonais sem qualquer modificação experimental. O uso dos anticorpos monoclonais resultou em uma barra SBSE com fase imunosorvente com maior capacidade adsortiva, com consequente aumento da linearidade do método SBSE/LC-FD, além de ter apresentado menor reatividade cruzada com o metabólito norfluoxetina.

Desta forma, a especificidade inerente dos anticorpos (fase imunosorvente para SBSE) fez, dos métodos desenvolvidos, uma poderosa ferramenta analítica para a determinação de fluoxetina em amostras complexas, como as amostras de plasma humano. Consequentemente, esses métodos foram aplicados com êxito em amostras de pacientes idosos em terapia com Prozac[®] para fins de monitorização terapêutica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; FRANK, D.; 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.
- [2] BALBÃO, M. S.; BERTUCCI, C.; BERGAMASCHI, M. M.; QUEIROZ, R. H. C.; MALFARÁ, W. R.; DROSSI, S. A. C.; MELLO, L. P.; QUEIROZ, M. E. C. Rifampicin determination in plasma by stir bar-sorptive extraction and Liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 1078-1083, 2010.
- [3] UNCETA, N.; UGARTE, A.; SÁNCHEZ, A.; GÓMEZ-CABALLERO, A.; GOICOLEA, M. A.; BARRIO, R. J. Development of a stir bar sorptive extraction based HPLC-FLD method for the quantification of serotonin reuptake inhibitors in plasma, urine and brain tissue samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 178-185, 2010.
- [4] DAVID, F.; SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction for trace analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, p. 54-69, 2007.
- [5] Twister/ Stir Bar Sorptive Extraction SBSE. Gerstel home page (Global Analytical Solutions). Disponível em: <http://www.gerstel.com/en/twister-stir-bar-sorptive-extraction.htm>. Acesso em: 18 de outubro de 2010.
- [6] Gerstel: TDS. Disponível em: <http://www.instrument.com.cn/netshow/C12034.htm>. Acesso em: 18 de outubro de 2010.
- [7] KAWAGUCHI, M.; ITO, R.; SAITO, K.; NAKAZAWA, H. Novel stir bar sorptive extraction methods for environmental and biomedical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 500-508, 2006.
- [8] QUEIROZ, R. H. C.; BERTUCCI, C.; MALFARÁ, W. R.; DROSSI, S. A. C.; CHAVES, A. R.; VALÉRIO, D. A. R.; QUEIROZ, M. E. C. Quantification of carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, phenytoin and phenobarbital in plasma samples by stir bar-sorptive extraction and liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 428-434, 2008.
- [9] FERNANDES, C.; VAN HOECK, E.; SANDRA, P.; LANÇAS, F.M. Determination of fluoxetine in plasma by gas chromatography-mass spectrometry using stir bar sorptive extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 614, p. 201-207, 2008.

- [10] SILVA, A. R. M.; NOGUEIRA, J. M. F. New approach on trace analysis of triclosan in personal care products, biological and environmental matrices. **Talanta**, v. 74, p. 1498-1504, 2008.
- [11] KAWAGUCHI, M.; ITO, R.; HONDA, H.; ENDO, N.; OKANOUCI, N.; SAITO, K.; SETO, Y.; NAKAZAWA, H. Determination of urinary triclosan by stir bar sorptive extraction and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 875, p. 577-580, 2008.
- [12] 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.
- [13] STOPFORTH, A.; BURGER, B. V.; CROUCH, A. M.; SANDRA, P. The analysis of estrone and 17 β -estradiol by stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography/mass spectrometry: Application to urine samples after oral administration of conjugated equine estrogens. **Journal of Chromatography B**, v. 856, p. 156-164, 2007.
- [14] STOPFORTH, A.; GROBBELAAR, C. J.; CROUCH, A. M.; SANDRA, P. Quantification of testosterone and epitestosterone in human urine samples by stir bar sorptive extraction – thermal desorption – gas chromatography/mass spectrometry: Application to HIV-positive urine samples. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 257-265, 2007.
- [15] KAWAGUCHI, M.; ITO, R.; SAKUI, N.; OKANOUCI, N.; SAITO, K.; SETO, Y.; NAKAZAWA, H. Stir-bar-sorptive extraction, with in-situ deconjugation, and thermal desorption with in-tube silylation, followed by gas chromatography-mass spectrometry for measurement of urinary 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol glucuronides. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, p. 391-398, 2007.
- [16] STOPFORTH, A.; BURGER, B. V.; CROUCH, A. M.; SANDRA, P. Urinalysis of 4-hydroxynonenal, a marker of oxidative stress, using stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 834, p. 134-140, 2006.
- [17] JOSEPH, A. C.; MICHAEL, F. B.; CHRISTOPHER, W. L.; JANSSEN, K. J. Performance evaluation of thermal desorption system (TDS) for detection of basic drugs in forensic samples by GC-MS. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 30, p. 581-592, 2006.
- [18] 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.

[19] ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J. M. F. Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1303-1311, 2006.

[20] KAWAGUCHI, M.; ITO, R.; HAYATSU, Y.; NAKATA, H.; SAKUI, N.; OKANOUCI, N.; SAITO, K.; YOKOTA, H.; IZUMI, S.; MAKINO, T.; NAKAZAWA, H. Stir bar sorptive extraction with in situ de-conjugation and thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry for measurement of 4-nonylphenol glucuronide in human urine sample. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 82-87, 2006.

[21] STOPFORTH, A.; TREDoux, A.; CROUCH, A.; VAN HELDEN, P.; SANDRA, P. A rapid method of diagnosing pulmonary tuberculosis using stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1071, p. 135-139, 2005.

[22] KAWAGUCHI, M.; ISHII, Y.; SAKUI, N.; OKANOUCI, N.; ITO, R.; SAITO, K.; NAKAZAWA, H. Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for determination of chlorophenols in water and body fluid samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 533, p. 57-65, 2005.

[23] ZHANG, J. X.; SOINI, H. A.; BRUCE, K. E.; WIESLER, D.; WOODLEY, S. K.; BAUM, M. J.; NOVOTNY, M. V. Putative chemosignals of the ferret (*Mustela furo*) associated with individual and gender recognition. **Chemical Senses**, v. 30, p. 727-737, 2005.

[24] KAWAGUCHI, M.; SAKUI, N.; OKANOUCI, N.; ITO, R.; SAITO, K.; IZUMI, S.; MAKINO, T.; NAKAZAWA, H. Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for measurement of phenolic xenoestrogens in human urine samples. **Journal of Chromatography B**, v. 820, p. 49-57, 2005.

[25] KAWAGUCHI, M.; INOUE, K.; YOSHIMURA, M.; ITO, R.; SAKUI, N.; OKANOUCI, N.; NAKAZAWA, H. Determination of bisphenol A in river water and body fluid samples by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 805, p.41-48, 2004.

[26] KAWAGUCHI, M.; INOUE, K.; SAKUI, N.; IZUMI, S.; MAKINO, T.; OKANOUCI, N.; NAKAZAWA, H. Stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for the measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human biological samples. **Journal of Chromatography B**, v. 799, p. 119-125, 2004.

[27] DESMET, K.; TIENPONT, B.; SANDRA, P. Analysis of 1-hydroxypyrene in urine as PAH exposure marker using in-situ derivatisation stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry. **Chromatographia**, v. 57, p. 681-685, 2003.

[28] TIENPONT, B.; DAVID, F.; STOPFORTH, A.; SANDRA, P. Comprehensive profiling of drugs of abuse in biological fluids by stir-bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry. **LC-GC Europe**, v. 16, p. 5-13, 2003.

[29] TIENPONT, B.; DAVID, F.; BENIJTS, T.; SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary GC-MS for profiling and target component analysis of pharmaceutical drugs in urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 569-579, 2002.

[30] WAHL, H. G.; PETERFI, C.; WERNER, R.; LIEBICH, H. M. Analysis of barbiturates in urine by stir bar sorptive extraction and thermal desorption GC-MS. **Clinical Chemistry**, v. 48, B9, 2002.

[31] KUMAZAWA, T.; LEE, X. P.; TAKANO, M.; SENO, H.; ARINOBU, T.; ISHII, A.; SUZUKI, O.; SATO, K. Determination of caffeine and theophylline in human whole blood by stir bar sorptive extraction (SBSE) - Thermal desorption - Capillary gas chromatography - Mass spectrometry. **Japanese Journal of Forensic Toxicology**, v. 20, p. 295-302, 2002.

[32] TIENPONT, B.; DAVID, F.; DESMET, K.; SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary GC-MS applied to biological fluids. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, p. 46-55, 2002.

[33] WAHL, H. G.; WERNER, R.; PETERFI, C.; LIEBICH, H. M. Analysis of di(2-ethylhexyl) phthalate and other plasticizers in body fluids and infusates by Stir Bar Sorptive Extraction and Thermal Desorption GC-MS. **Clinical Chemistry**, v. 48, B10, 2002.

[34] BENIJTS, T.; VERCAMMEN, J.; DAMS, R.; TUAN, H. P.; LAMBERT, W.; SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry applied to the analysis of polychlorinated biphenyls in human sperm. **Journal of Chromatography B**, v. 755, p. 137-142, 2001.

[35] 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.

[36] HUANG, X.; YUAN, D.; HUANG, B. Determination of steroid sex hormones in urine matrix by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and liquid chromatography with diode array detection. **Talanta**, v. 75, p.172-177, 2008.

[37] 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.

[38] FARJAM, A.; JONG, G. J.; FREI, R. W.; BRINKMAN, U. A. TH.; HAASNOOT, W.; HAMERS, A. R. M.; SCHILT, R.; HUF, F. A. Immunoaffinity pre-column for selective on-line sample pre-treatment in high-performance liquid chromatography determination of 19-nortestosterone. **Journal of Chromatography**, v. 452, p. 419-433, 1988.

[39] HAASNOOT, W.; SCHILT, R.; HAMER, A. R. M.; HUF, F. A.; FARJAM, A.; FREI, R. W.; BRINKMAN, U. A. TH. Determination of β -19-nortestosterone and its metabolite α -19-nortestosterone in biological samples at the sub parts per billion level by high-performance liquid chromatography with on-line immunoaffinity sample pretreatment. **Journal of Chromatography**, v. 489, p. 157-171, 1989.

[40] FARJAM, A.; BRUGMAN, A. E.; SOLDAAT, A.; TIMMERMAN, P.; LINGEMAN, H.; JONG, G. J.; FREI, R. W.; BRINKMAN, U. A. TH. Immunoaffinity pre-column for selective sample pretreatment in column liquid chromatography: immunoselective desorption. **Chromatographia**, v. 314, p. 69-477, 1991.

[41] FARJAM, A.; VRIES, R.; LINGEMAN, H.; FREI, R. W.; BRINKMAN, U. A. TH. Immuno pre-columns for Selective On-Line Sample Pretreatment of Aflatoxins in Milk Prior to Column Liquid Chromatography. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 44, p. 175-184, 1991.

[42] FARJAM, A.; VAN DE MERBEL, N. C.; LINGEMAN, H.; FREI, R. W.; BRINKMAN, U. A. TH. Non-selective desorption of immuno precolumns coupled on-Line with column liquid chromatography: determination of aflatoxins. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 45, p. 73-87, 1991.

[43] FARJAM, A.; VAN DE MERBEL, N. C.; NIEMAN, A. A.; LINGEMAN, H.; BRINKMAN, U. A. TH. Determination of aflatoxin M1 using a dialysis-based immunoaffinity sample pretreatment system coupled online to liquid chromatography: Reusable immunoaffinity columns. **Journal of Chromatography**, v. 589, p. 141-149, 1992.

[44] PICHON, V.; CHEN, L.; HENNION, M. C.; DANIEL, R.; MARTEL, A.; LE GOFFIC, F.; ABIAN, J.; BARCELÓ, D. Preparation and Evaluation of Immunosorbents for Selective

Trace Enrichment of Phenylurea and Triazine Herbicides in Environmental Waters. **Analytical Chemistry**, v. 67, p. 2451-2460, 1995.

[45] PICHON, V.; CHEN, L.; HENNION, M.C. On-line preconcentration and liquid chromatographic analysis of phenylurea pesticides in environmental water using a silica-based immunosorbent. **Analytica Chimica Acta**, v. 311, p. 429-436, 1995.

[46] PICHON, V.; CHEN, L.; DURAND, N.; LEGOFFIC, F.; HENNION, M. C. Selective trace enrichment on immunosorbents for the multiresidue analysis of phenylurea and triazine pesticides. **Journal of Chromatography A**, v. 725, p. 107-119, 1996.

[47] LAWRENCE, J. F.; MÉNARD, C.; HENNION, M. C.; PICHON, V.; LE GOFFIC, F.; DURAND, N. Use of immunoaffinity chromatography as a simplified cleanup technique for the liquid chromatographic determination of phenylurea herbicides in plant material. **Journal of Chromatography A**, v. 732, p. 277-281, 1996.

[48] LAWRENCE, J. F.; MÉNARD, C.; HENNION, M. C.; PICHON, V.; LE GOFFIC, F.; DURAND, N. Evaluation of immunoaffinity chromatography as a replacement for organic solvent clean-up of plant extracts for the determination of triazine herbicides by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 752, p. 147-154, 1996.

[49] PICHON, V.; AULARD-MACLER, E.; OUBIHI, H.; SASSIAT, P.; HENNION, M. C.; CAUDE, M. Supercritical-fluid extraction coupled with immunoaffinity clean-up for the trace analysis of organic pollutants in different matrices. **Chromatographia**, v. 46, p. 529-536, 1997.

[50] FERRER, I.; HENNION, M. C.; BARCELÓ, D. Immunosorbents Coupled On-Line with Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization/Mass Spectrometry for the Part per Trillion Level Determination of Pesticides in Sediments and Natural Waters Using Low Preconcentration Volumes. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 4508-4514, 1997.

[51] PICHON, V.; ROGNIAUX, H.; FISCHER-DURAND, N.; BEN REJEB, S.; LEGOFFIC, F.; HENNION, M. C. Characteristics of immunosorbents used as a new approach to selective solid-phase extraction in environmental analysis. **Chromatographia**, v. 45, 289-295, 1997.

[52] BOUZIGE, M.; LEGEAY, P.; PICHON, V.; HENNION, M. C. Selective on-line immunoextraction coupled to liquid chromatography for the trace determination of benzidine, congeners and related azo dyes in surface water and industrial effluents. **Journal of Chromatography A**, v. 846, p. 317-329, 1999.

[53] THOMAS, S. D.; LI, Q. X. immunoaffinity Chromatography for Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Corals. **Environmental Science & Technology**, v. 34, p. 2649-2654, 2000.

[54] SHAHTAHERI, S. J.; KATMEH, M. F.; KWASOWSKI, P.; STEVENSON, D. Development and optimisation of an immunoaffinity-based solid-phase extraction for chlortoluron. **Journal of Chromatography A**, v. 697, p.131-136, 1995.

[55] MARTIN-ESTEBAN, A.; KWAZOWSKI, P.; STEVENSON, D. Immunoaffinity-based extraction of phenylurea herbicides using mixed antibodies against isoproturon and chlortoluron. **Chromatographia**, v. 45, p. 364-368, 1997.

[56] MARTIN-ESTEBAN, A.; FERNÁNDEZ, P.; STEVENSON, D.; CÁMARA, C. Mixed Immunosorbent for Selective On-line Trace Enrichment and Liquid Chromatography of Phenylurea Herbicides in Environmental Waters. **Analyst**, v. 122, p. 1113-1117, 1997.

[57] HERRERA, S.; MARTIN-ESTEBAN, A.; FERNÁNDEZ, P.; STEVENSON, D.; CÁMARA, C. Evaluation of a mixed immunosorbent for selective trace enrichment of phenylurea herbicides from plant material. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 362, p. 547-551, 1998.

[58] FERRER, I.; PICHON, V.; HENNION, M. C.; BARCELÓ, D. Automated sample preparation with extraction columns by means of anti-isoproturon immunosorbents for the determination of phenylurea herbicides in water followed by liquid chromatography–diode array detection and liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 777, p. 91-98, 1997.

[59] KATMEH, M. F.; GODFREY, A. J. M.; STEVENSON, D.; AHERNE, G. W. Enzyme Immunoaffinity Chromatography-A Rapid Semi-quantitative Immunoassay Technique for Screening the Presence of Isoproturon in Water Samples. **Analyst**, v. 122, p. 481-486, 1997.

[60] BOUZIGE, M.; PICHON, V.; HENNION, M. C. On-line coupling of immunosorbent and liquid chromatographic analysis for the selective extraction and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples at the ng L^{-1} level. **Journal of Chromatography A**, v. 823, p. 197-210, 1998.

[61] PEREZ, S.; FERRER, I.; HENNION, M.C.; BARCELÓ, D. Isolation of Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Natural Sediments and Sludge Reference Materials by an Anti-Fluorene Immunosorbent Followed by Liquid Chromatography and Diode Array Detection. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 4996-5001, 1998.

[62] PEREZ, S.; BARCELÓ, D. Evaluation of anti-pyrene and anti-fluorene immunosorbent clean-up for PAHs from sludge and sediment reference materials followed by liquid chromatography and diode array detection. **Analyst**, v. 125, p. 1273-1279, 2000.

[63] SHAHTAHERI, S. J.; KWAZOWSKI, P.; STEVENSON, D. Highly selective antibody-mediated extraction of isoproturon from complex matrices. **Chromatographia**, v. 47, p. 453-456, 1998.

[64] OUYANG, S.; XU, Y.; CHEN, Y. H. Selective Determination of a Group of Organic Compounds in Complex Sample Matrixes by LC/MIMS with On-Line Immunoaffinity Extraction. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 931-935, 1998.

[65] CICHNA, M.; MARKL, P.; KNOPP, D.; NIESSNER, R. Optimization of the Selectivity of Pyrene Immunoaffinity Columns Prepared by the Sol-Gel Method. **Chemical of Materials**, v. 9, p. 2640-2646, 1997.

[66] CICHNA, M.; KNOPP, D.; NIESSNER, R. Immunoaffinity chromatography of polycyclic aromatic hydrocarbons in columns prepared by the sol-gel method. **Analytica Chimica Acta**, v. 339, p. 241-250, 1997.

[67] MIÈGE, C.; BOUZIGE, M.; NICOL, S.; DUGAY, J.; PICHON, V.; HENNION, M. C. Selective immunoclean-up followed by liquid or gas chromatography for the monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban waste water and sewage sludges used for soil amendment. **Journal of Chromatography A**, v. 859, p. 29-39, 1999.

[68] BOUZIGE, M.; PICHON, V.; HENNION, M.C. Class-Selective Immunosorbent for Trace-Level Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Complex Sample Matrixes, Used in Off-line Procedure or On-line Coupled with Liquid Chromatography/Fluorescence and Diode Array Detections in Series. **Environmental Science & Technology**, v. 33, p. 1916-1925, 1999.

[69] DELAUNAY-BERTONCINI, N.; PICHON, V.; HENNION, M. C. Comparison of immunoextraction sorbents prepared from monoclonal and polyclonal anti-isoproturon antibodies and optimization of the appropriate monoclonal antibody-based sorbent for environmental and biological applications. **Chromatographia**, v. 53, p. S224-S230, 2001.

[70] NUNES, G. S. Métodos imunoquímicos para análise de contaminantes ambientais: conceitos, estado da arte e perspectivas. **Química Nova**, v. 28, p. 462-471, 2005.

[71] BENJAMINI, E.; LESKOWITZ, S.; **Immunology: a short course**, 2nd ed., Wiley-Liss: New York, 1991.

[72] ERLANGER, B. F. The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: a survey. **Methods in Enzymology**, v. 70, p. 85-104, 1980.

[73] BURRIN, J.; NEWMAN, D. J. In: **Principles and practice of immunoassay**. PRICE, C. P.; NEWMAN, D. J., eds.; Stockton Press: New York, 1991, p. 19.

[74] HURN, B. A. L.; CHANTLER, S. M. Production of reagent antibodies. **Methods in Enzymology**, v. 70, p. 104-142, 1980.

[75] ROITT, I. **Essential immunology**. Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1980.

[76] DRESSER, D. W. **Immunization of experimental animals**. In: Handbook of experimental immunology. WEIR, D. M., ed.; Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1986.

[77] ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; SHIV, P. **Imunologia Celular e Molecular**. Ed: Elsevier Brasil, 6^a Ed. 2008.

[78] NISNEVITCH, M.; FIER, M. A. The solid phase in affinity chromatography: strategies for antibody attachment. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49, p. 467-480, 2001.

[79] LU, B.; SMYTH, M. R.; O'KENNEDY, R. Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors. **Analyst**, v. 121, p. 29R-32R, 1996.

[80] GAZZAZ, S. S.; RASCO, B. A.; DONG, F. M. Application of immunochemical assays to food analysis. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, p. 197-229, 1992.

[81] SÁNCHEZ, M. C. A. Testes Sorológicos. In: Abbas, A.K.; Lichtman, A. H.; Pober, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. Revinter, Rio de Janeiro, 1998, p. 19-22.

[82] AMERSHAM BIOSCIENCES. **Antibody purification handbook**. Piscataway: Pharmacia & Upjohn, 1999.

[83] DELAUNAY-BERTONCINI, N.; HENNION M. C. Immunoaffinity solid-phase extraction for pharmaceutical and biomedical trace-analysis-coupling with HPLC and CE-perspectives. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, p. 717-736, 2004.

[84] HENION, M. C.; PICHON, V. Immuno-based sample preparation for trace analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 29-52, 2003.

[85] DELAUNAY, N.; PICHON, V.; HENION, M. C. Immunoaffinity solid-phase extraction for the trace-analysis of low-molecular-mass analytes in complex sample matrices. **Journal of Chromatography B**, v. 745, p. 15-37, 2000.

[86] HENION, M.C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 856, p. 3-54, 1999.

[87] YOSHIOKA, M.; MUKAI, Y. Immobilization of ultra-thin layer of monoclonal antibody on glass surface. **Journal of Chromatography**, v. 566, p. 361-369, 1991.

[88] PFEIFFER, N. E.; WYLIE, D. E.; SCHUSTER, S. M. Immunoaffinity chromatography utilizing monoclonal antibodies. Factors which influence antigen-binding capacity. **Journal of Immunological Methods**, v. 97, p. 1-9, 1987.

[89] WIMALASENA, R. L.; WILSON, G. S. Factors affecting the specific activity of immobilized antibodies and their biologically active fragments. **Journal of Chromatography**, v. 572, p. 85-102, 1991.

[90] LIN, J. N.; CHANG, I. N.; ANDRADE, J. D.; HERRON, J. N.; CHRISTENSEN, D. A. Comparison of site-specific coupling chemistry for antibody immobilization on different solid supports. **Journal of Chromatography**, v. 542, p. 41-54, 1991.

[91] PEOPLES, M. C.; KARNES, H. T. Microfluidic immunoaffinity separations for bioanalysis. **Journal of Chromatography B**, v. 866, p. 14-25, 2008.

[92] MAJORS, R. Immunosorbents for selective sample preparation of complex mixtures. **LC-GC North America**, v. 21, p. 10-19, 2008.

[93] XU, L.; QIU, S.; SUN, C.-J.; DENG, Q.-P.; CHEN, H.-X.; ZHOU, Y.-L.; ZHANG, X.-X. Determination of epitestosterone in human urine by off-line immunoaffinity solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 1443-1448, 2010.

[94] HOSOGI, J.; TANAKA, H.; FUJITA, K.; KUWABARA, T.; IKEGAWA, S.; KOBAYASHI, N.; MANO, N.; GOTO. LC-MS/MS coupled with immunoaffinity extraction for determination of estrone, 17-estradiol and estrone-3-sulfate in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 222-227, 2010.

[95] QIU, S.; XU, L.; CUI, Y. R.; DENG, Q.-P.; WANG, W.; CHEN, H. -X.; ZHANG, X.-X. Pseudo-homogeneous immunoextraction of epitestosterone from human urine samples based on gold-coated magnetic nanoparticles. **Talanta**, v. 81, p. 819-823, 2010.

[96] CHEN, H.-X.; HUANG, T.; ZHANG, X.-X. Immunoaffinity extraction of testosterone by antibody immobilized monolithic capillary with on-line laser-induced fluorescence detection. **Talanta**, v. 78, p. 259-264, 2009.

[97] AMUNDSEN, L.; NEVANEN, T. K.; TAKKINEN K.; ROVIO, S.; SIRÉN, H. Microscale immunoaffinity SPE and MEKC in fast determination of testosterone in male urine. **Electrophoresis**, v. 28, p. 3232-3241, 2007.

[98] NICHKOVA, M.; MARCO, M. P. Development and evaluation of C18 and immunosorbent solid-phase extraction methods prior immunochemical analysis of chlorophenols in human urine. **Analytica Chimica Acta**, v. 533, p. 67-82, 2005.

[99] ZHAO, M.; LIU, Y.; LI, Y.; ZHANG, X.; CHANG, W. Development and characterization of an immunoaffinity column for the selective extraction of bisphenol A from serum samples. **Journal of Chromatography B**, v. 783, p. 401-410, 2003.

[100] DICKSON, L. C.; MACNEIL, J. D.; REID, J.; NEISER, C. D.; FESSER, A. C. E. Internal validation of screening methodology for residues of epi-trenbolone, trenbolone, epi-nortestosterone and nortestosterone in bovine urine using immunoaffinity cartridges for sample clean-up. **Analytica Chimica Acta**, p. 111-118, 2002.

[101] RHEMREV-BOOM, M. M.; YATES, M.; RUDOLPH, M.; RAEDTS, M. (Immuno) affinity chromatography: a versatile tool for fast and selective purification, concentration, isolation and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 825-833, 2001.

[102] DRIEDGER, D. R.; SPORNS, P. Immunoaffinity Sample Purification and MALDI-TOF MS Analysis of α -Solanine and α -Chaconine in Serum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 543-548, 2001.

[103] HOLTZAPPLE, C. K.; PISHKO, E. J.; STANKER, L. H. Separation and Quantification of Two Fluoroquinolones in Serum by On-Line High-Performance Immunoaffinity Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 4148-4153, 2000.

[104] BEIKE J.; KÖHLER, H.; BRINKMANN, B.; BLASCHKE, G. Immunoaffinity extraction of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide from blood of

heroin victims for simultaneous high-performance liquid chromatographic determination. **Journal of Chromatography B**, v. 726, p. 111-119, 1999.

[105] BENTSEN, R.K.; BOTNEN, I.V.; NOTO, H.; JACOB, J.; OVREBO, S. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites by high-pressure liquid chromatography after purification on immunoaffinity columns in urine from occupationally exposed workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, v. 72, p. 161-168, 1999.

[106] KOOLE, A.; BOSMAN, J.; FRANKE, J. P.; ZEEUW, R. A. Multiresidue analysis of β_2 -agonists in human and calf urine using multimodal solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography B**, v. 726, p. 149-156, 1999.

[107] KAWATSU, K.; SHIBATA, T.; HAMANO, Y. Application of immunoaffinity chromatography for detection of tetrodotoxin from urine samples of poisoned patients. **Toxicol**, v. 37, p. 325-333, 1999.

[108] RASHID, B. A.; AHERNE, G. W.; KATMEH, M. F.; KWASOWSKI, P.; STEVENSON, D. Determination of morphine in urine by solid-phase immunoextraction and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography A**, v. 797, p. 245-250, 1998.

[109] DUBOIS, M.; TAILLIEU, X.; COLEMONT, Y.; LANSIVAL, B.; DELAHAUT, P.; GRAEVE, J. GC-MS determination of anabolic steroids after multi-immunoaffinity purification. **Analyst**, v. 123, p. 2611-2616, 1998.

[110] KUSSAK, A.; ANDERSSON, B.; ANDERSSON, K.; NILSSON, C. A. Determination of aflatoxin in human urine by immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography. **Chemosphere**, v. 36, p. 1841-1848, 1998.

[111] IKEGAWA, S.; MATSUURA, K.; SATO, T.; ISRIYANTHI, N. M.; NIWA, T.; MIYAIRI, S.; TAKASHIMA, H.; KAWASHIMA, Y.; GOTO, J. Enantioselective immunoaffinity extraction for simultaneous determination of optically active bufuralol and its metabolites in human plasma by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, p. 1-9, 1998.

[112] CREASER, C. S.; FEELY, S. J.; HOUGHTON, E.; SEYMOUR, M. Immunoaffinity chromatography combined on-line with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of corticosteroids. **Journal of Chromatography A**, v. 794, p. 37-43, 1998.

[113] DEINL, I.; ANGERMAIER, L.; FRANZELIUS, C.; MACHBERT, G. Simple high-performance liquid chromatographic column-switching technique for the on-line immunoaffinity extraction and analysis of flunitrazepam and its main metabolites in urine. **Journal of Chromatography B**, v. 704, p. 251-258, 1997.

[114] CAI, J.; HENION, J. Quantitative multi-residue determination of β -agonists in bovine urine using on-line immunoaffinity extraction-coupled column packed capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 691, p. 357-370, 1997.

[115] CAI, J.; HENION, J. On-Line Immunoaffinity Extraction-Coupled Column Capillary Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry: Trace Analysis of LSD Analogs and Metabolites in Human Urine. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 72-78, 1996.

[116] GUZMAN, N. A.; TREBILCOCK, M. A.; ADVIS, J. P. The Use of a Concentration Step to Collect Urinary Components Separated by Capillary Electrophoresis and Further Characterization of Collected Analytes by Mass Spectrometry. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 14, p. 997-1015, 1991.

[117] FARJAM, A.; BRUGMAN, A. E.; SOLDAAT, A.; TIMMERMAN, P.; LINGEMAN, H.; JONG, G. J.; FREI, R. W.; BRINKMAN, U. A. TH. Immunoaffinity precolumn for selective sample pretreatment in column liquid chromatography: immunoselective desorption. **Chromatographia**, v. 31, p. 469-477, 1991.

[118] YUAN, H.; MULLETT, W. M.; PAWLISZYN, J. Biological sample analysis with immunoaffinity solid-phase microextraction. **Analyst**, v. 126, p. 1456-1461, 2001.

[119] LORD, H. L.; RAJABI, M.; SAFARI, S.; PAWLISZYN, J. Development of immunoaffinity solid phase microextraction probes for analysis of sub ng/mL concentrations of 7-aminoflunitrazepam in urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 769-780, 2006.

[120] LORD, H. L.; RAJABI, M.; SAFARI, S.; PAWLISZYN, J. A study of the performance characteristics of immunoaffinity solid phase microextraction probes for extraction of a range of benzodiazepines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 506-519, 2007.

[121] QUEIROZ, M. E. C.; OLIVEIRA, E. B.; BRETON, F.; PAWLISZYN, J. Immunoaffinity in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry for analysis of fluoxetine in serum samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1174, p. 72-77, 2007.

[122] RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

[123] Legislação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em 18 de outubro de 2010. Resolução RE nº 899, "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos", publicado no D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 02 de junho de 2003.

[124] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

[125] JÖNSSON, U.; MALMQVIST, M.; RÖNNBERG, I. Immobilization of immunoglobulins on silica surfaces. Stability. **Journal of Biochemistry**, v. 227, p. 363-371, 1985.

[126] LIN, J.N.; HERRON, J.; ANDRADE, J.D.; BRIZGYS, M. Characterization of immobilized antibodies on silica surfaces. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 35, p. 466-471, 1988.

[127] WILLIAMSON, M. L.; ATHA, D. H.; REEDER, D. J.; SUNDARAM, P. V. Anti-T₂ monoclonal antibody immobilization on quartz fibers: stability and recognition of T₂ mycotoxin. **Analytical Letters**, v. 22, p. 803-816, 1989.

[128] LIN, J. N.; ANDRADE, J. D.; CHANG, I. N. The influence of adsorption of native and modified antibodies on their activity. **Journal of Immunological Methods**, v. 125, p. 67-77, 1989.

[129] LEPESHEVA, G. I.; AZEVA, T. N.; KNYUKSHTO, V. N.; CHASHCHIN, V. L.; USANOV, S. A. A model of optical immunosensor for hemoproteins based on Langmuir-Blodgett films of FITC-labelled immunoglobulin G. **Sensors and Actuators B**, v. 68, 27-33, 2000.

Capítulo 3

Microextração em sorvente empacotado em conjunto ao sistema cromatográfico LC-UV para análise de antidepressivos em amostras de plasma

1 INTRODUÇÃO

1.1 Microextração em sorvente empacotado

1.1.1 Fundamentos Teóricos ^[1-4]

A microextração em sorvente empacotado (MEPS), recente técnica de preparo de amostra, baseia-se na miniaturização da técnica de extração em fase sólida convencional (SPE). O volume de solvente utilizado na etapa de eluição dos analitos, bem como o volume de amostra requerido foram reduzidos da ordem de mililitros para microlitros (10-1000 μL).

A MEPS quando comparada à microextração em fase sólida (SPME) apresenta menor tempo de análise e maiores taxas de recuperação, resultando em metodologias com maior sensibilidade analítica. A **Tabela 3.1** apresenta alguns parâmetros comparados entre as técnicas MEPS, SPME e SPE.

Tabela 3.1 Comparações de parâmetros entre as técnicas MEPS, SPE e SPME [4].

Parâmetro	MEPS	SPE	SPME
Quantidade de sorvente	0,5-2 mg	50-2000 mg	Espessura: 150 μm
Tempo de preparo de amostra	1-2 min	10-15 min	10-40 min
Reutilização do sorvente	40-100 extrações	Uma vez	50-70 extrações
Recuperação	Boa	Boa	Baixa
Sensibilidade	Boa	Boa	Baixa

Em MEPS, uma microcoluna ($\approx 1 \text{ cm} \times 0,2 \text{ mm d.i.}$) empacotada com cerca de 1 ou 2 mg de sólido sorvente é integrada à agulha de uma microseringa (100-250 μL), conforme ilustrado na **Figura 3.1**.

A MEPS pode ser hifenada às técnicas de separação, LC, GC ou à eletroforese capilar (CE), onde os analitos sorvidos na microcoluna podem ser eluídos (dessorvidos), durante a etapa de introdução (injeção) da amostra no sistema analítico. O processo MEPS (extração e introdução da amostra) também pode ser totalmente automatizado, quando acoplado ao injetor automático.

Diferentes fases seletivas MEPS, com diferentes mecanismos de extração, são comercialmente disponíveis (SGE Analytical Science), tais como sílica (fase normal), C2, C8, C18 (fase reversa), trocador forte de cátions (SCX), trocador forte de ânions (SAX) e fase mista (C8 + SCX).

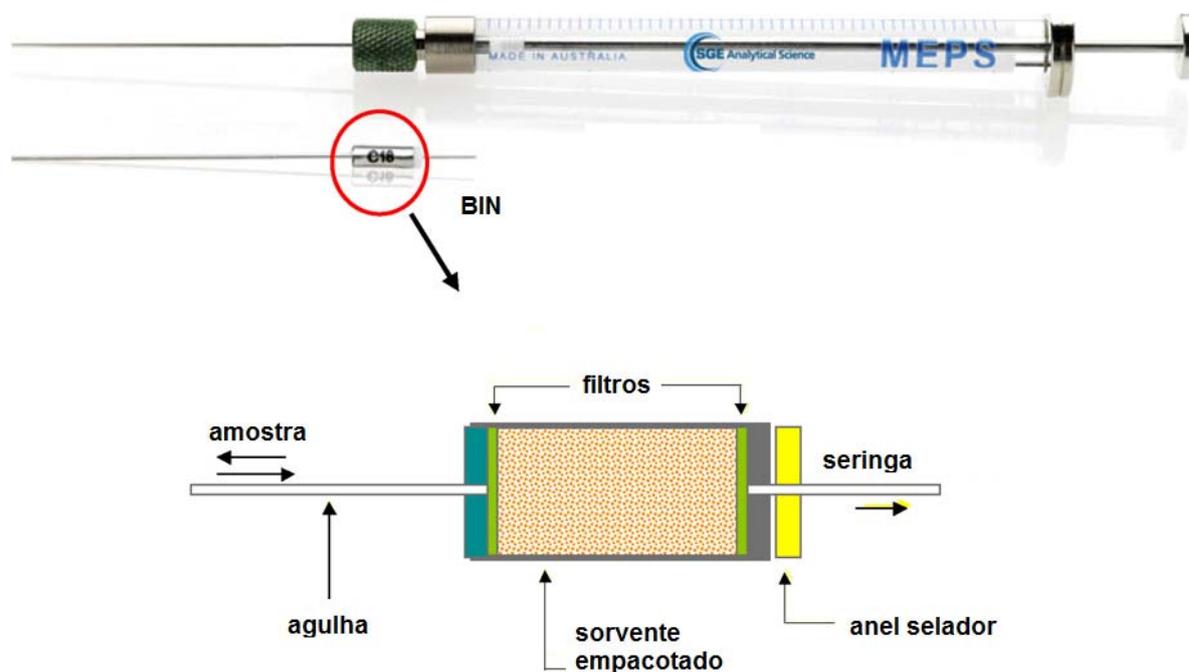


Figura 3.1 Microseringa MEPS (250 μL) e microcoluna com material sorvente empacotado. O volume morto é de aproximadamente 7 μL . Adaptado de [1].

1.1.2 Processo MEPS para análise de fluidos biológicos ^[1-4]

Inicialmente, as amostras de fluidos biológicos (10-250 μL) têm sido submetidas a uma etapa de pré-tratamento, destacando-se a diluição das amostras em água ou em solução tampão (plasma- 1:4 e sangue- 1:20, v/v), centrifugação ou precipitação das proteínas. Assim como em SPE, as soluções tampão com valores de pH extremos ($7 < \text{pH} < 3$) podem danificar as fases sorventes à base de sílica.

Com o auxílio da microseringa MEPS, os fármacos são sorvidos (pré-concentrados) na fase sólida através dos processos aspirar/dispensar a amostra no mesmo frasco contendo o

fluido biológico ou aspirar (frasco) e dispensar no descarte, no modo manual ou automático. A extração é realizada aspirando a amostra uma única vez ou mais (vários ciclos aspirar/dispensar), quando maior sensibilidade analítica é requerida.

Após a pré-concentração, a fase sólida é lavada com água ou solução água/metanol (50 μL) para remover os compostos endógenos da matriz. Nesta etapa de limpeza, a porcentagem de solvente orgânico, bem como o pH da solução, devem ser avaliados para minimizar a perda do analito. O aumento da porcentagem de solvente orgânico na solução eluente, aumenta a perda do analito.

Para minimizar o efeito da matriz e obter extratos mais puros, em análises de fármacos básicos, têm sido utilizadas soluções aquosas de limpeza com 5% de metanol ou 2-propanol (eliminação de fosfolipídeos).

Após a etapa de lavagem, os analitos são eluídos com solvente orgânico ou fase móvel (20-50 μL) diretamente no injetor do sistema analítico. O ajuste do pH da solução eluente (para analitos ionizáveis) é um fator importante para a obtenção de altas taxas de extração. Considerando a alça de amostragem LC, o volume de solvente requerido para a dessorção dos analitos deverá ser o menor possível. Com o aumento da porcentagem de solvente orgânico, ocorre um aumento do sinal analítico do analito. A **Figura 3.2** ilustra as etapas do processo MEPS.

Para a reutilização das microcolunas MEPS, estas têm sido lavadas (entre as injeções) de 3-4 vezes com água e 4-5 vezes com solvente utilizado na etapa de eluição. Este procedimento minimiza o efeito de memória para valores menores que 0,02 %, e condiciona a microcoluna MEPS para a próxima extração.

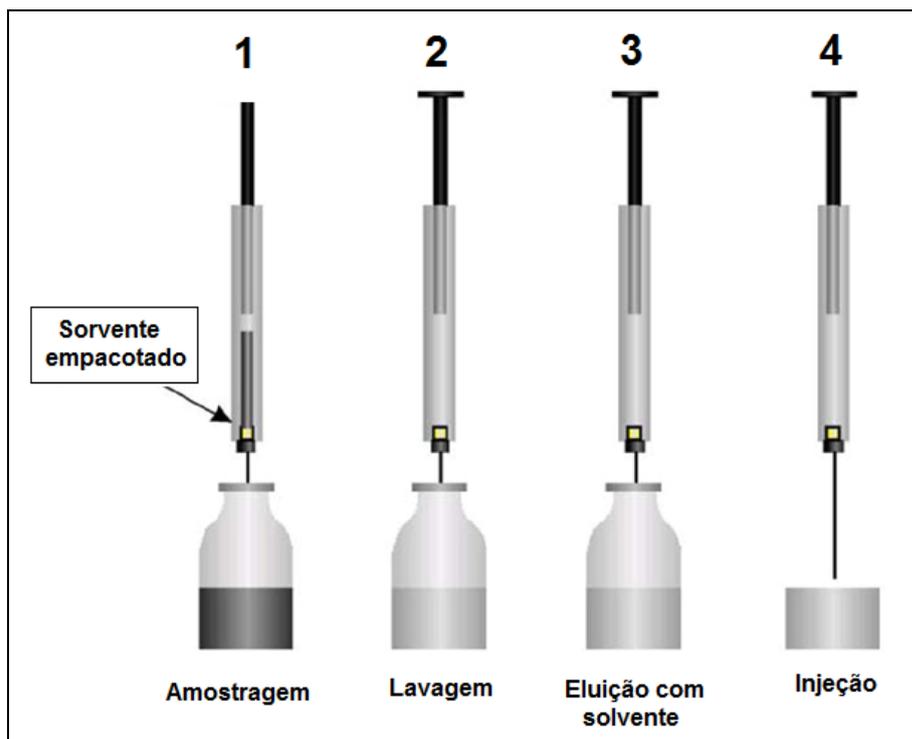


Figura 3.2 Ilustração das etapas do processo MEPS. Adaptado de [4].

Em trabalhos que reportam o uso de MEPS acoplado ao GC, não foi observado qualquer efeito de deterioração na eficiência da coluna de GC, mesmo com a utilização de grandes volumes de injeção (30-100 μL).

O microsorvente (microcoluna) tem sido reutilizado mais de 120 vezes sem perda significativa da eficiência das extrações MEPS para amostras de água e urina; já as colunas SPE, geralmente são utilizadas uma única vez e descartadas.

Em relação às amostras de plasma ou soro, o tratamento prévio da amostra é importante para aumentar o tempo de vida do sorvente MEPS. Este tem sido reutilizado mais de 100 vezes para as amostras de plasma centrifugadas e de 40 a 50 vezes para amostras de plasma não-centrifugadas.

A seleção do sorvente é um fator importante para a obtenção de altas taxas de recuperação, por exemplo: C2-C18 são fases adequadas para extração de analitos lipofílicos, já as fases poliméricas, tais como: poliestireno-divinilbenzeno com grupos iônicos

quimicamente ligados (troca iônica) ou fases mistas (C8 + SCX) são adequadas para as determinações de analitos polares como os compostos ácidos e básicos. Os materiais de acesso restrito (RAM) ou polímeros molecularmente impressos (MIPs) também têm sido utilizados como sorventes para MEPS.

1.1.3 Aplicações de MEPS para amostras biológicas

A técnica MEPS tem sido aplicada para a extração de uma grande variedade de fármacos e metabólitos em amostras biológicas para diferentes fins, conforme sumarizado na

Tabela 3.2.

Tabela 3.2 Aplicações da técnica MEPS para análise de fármacos e metabólitos em amostras biológicas.

Analito	Matriz/vol. de amostra	Sorvente	Método Analítico	LOQ	Referência
Anestésicos locais					
Lidocaína, mepivacaína e bupivacaína	Plasma (200 µL)	C18	CE-LC/MSD	5,4 µg mL ⁻¹ 4,9 µg mL ⁻¹ 2,1 µg mL ⁻¹	Valcárcel <i>et al</i> (2009) [5]
Lidocaína, ropivacaína e bupivacaína	Plasma (50 µL)	SCX	LC-MS/MS	2 nmol L ⁻¹	Blomberg <i>et al</i> (2004) [6]
Lidocaína, prilocaína, mepivacaína e ropivacaína	Plasma (50 µL)	C2	GC-MS/MS	5 nmol L ⁻¹	Abdel-Rehim <i>et al</i> (2004) [4]

Continua **Tabela 3.2...**

...Continuação da Tabela 3.2.

Analito	Matriz/vol. de amostra	Sorvente	Método Analítico	LOQ	Referência
Anestésicos locais					
Ropivacaína	Urina (50 µL)	Poliestireno ENV+	LC-MS/MS	5 nmol L ⁻¹	Blomberg <i>et al</i> (2006) [7]
	Plasma (50 µL)	MIP		2 nmol L ⁻¹	M. Abdel-Rehim <i>et al</i> (2006) [8]
	Plasma (50 µL)	C2 e C8		2 nmol L ⁻¹	Blomberg <i>et al</i> (2004) [9]
Fármacos anticancerígenos					
Ciclofosfamida	Sangue (20 µL)	C2	LC-MS/MS	0,1 µg mL ⁻¹	Abdel-Rehim <i>et al</i> (2009) [10]
	Plasma (25 µL)	C8		0,5 µg mL ⁻¹	Abdel-Rehim <i>et al</i> (2008) [11]
Busulfan	Plasma (25 µL)	Poliestireno	LC-MS	0,5 ng mL ⁻¹	Abdel-Rehim <i>et al</i> (2007) [12]
Roscovitina	Plasma (50 µL)	Poliestireno	LC-MS/MS	0,5 ng mL ⁻¹	Vita <i>et al</i> (2005) [13]
Olomoucina	Plasma (50 µL)	Poliestireno	LC-MS/MS	0,5 ng mL ⁻¹	Abdel-Rehim <i>et al</i> (2005) [14]
Antidepressivos e neurotransmissores					
Citalopram, fluoxetina, mirtazapina, paroxetina e sertralina	Plasma (400 µL)	C8+SCX	LC-UV	10 ng mL ⁻¹ 20 ng mL ⁻¹ 25 ng mL ⁻¹ 20 ng mL ⁻¹ 10 ng mL ⁻¹	Queiroz <i>et al</i> (2010) [15]

Continua Tabela 3.2...

...Continuação da Tabela 3.2.

Analito	Matriz/vol. de amostra	Sorvente	Método Analítico	LOQ	Referência
Antidepressivos e neurotransmissores					
Dopamina e serotonina	Urina (30 µL)	C8	LC-MS/MS GC-MS/MS	50 ng mL ⁻¹	El-Beqqali <i>et al</i> (2007) [16]
Antipsicóticos					
Risperidona e metabólitos	Saliva (100 µL) Plasma (100 µL)	C8	LC-Detector colorimétrico	0,5 ng mL ⁻¹ 0,5 ng mL ⁻¹	Saracino <i>et al</i> (2010) [17]
Beta-bloqueadores					
Acebutolol e metoprolol	Plasma, urina (50 µL)	Poliestireno	LC-MS/MS	1,0 ng mL ⁻¹	El-Beqqali <i>et al</i> (2007) [18]
Antibióticos					
Fluoroquinolonas: ofloxacina, marbofloxacina, enrofloxacina, danofloxacina e difloxacina	Urina (48 µL)	C18	CE-MS	12,5 µg L ⁻¹	Morales-Cid <i>et al</i> (2009) [19]
Drogas de abuso					
Cocaína e metabólitos	Urina (100 µL)	C8, ENV+, MCX	DART-TOF	65-1200 ng mL ⁻¹	Jagerdeo <i>et al</i> (2009) [20]
Anfetamina e metanfetamina	Cabelo	SCX:C18 (1:4)	GC/MS	0,20-50 ng mg ⁻¹	Miyaguchi <i>et al</i> (2009) [21]
Metadona	Urina (50 µL)	C8	LC-MS/MS	2,3-3100 ng mL ⁻¹	El-Beqqali <i>et al</i> (2007) [22]

LOQ: Limite de quantificação; **ENV+:** Copolímero de divinilbenzeno poliestireno-hidroxilado; **DART:** análise direta em tempo real; **TOF:** tempo de voo; **CE:** Eletroforese capilar; **MCX:** copolímero (polidivinilbenzeno-co-N-polivinil-pirrolidona) sulfônico; **MIP:** polímero molecularmente impresso.

Nesta segunda parte do trabalho, uma nova metodologia baseada na microextração em sorvente empacotado (MEPS) foi desenvolvida para análise LC/UV simultânea dos antidepressivos (fluoxetina, sertralina, citalopram, paroxetina e mirtazapina) em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica, como alternativa à SPE convencional.

2 OBJETIVOS

2.1 Otimização das variáveis do processo MEPS;

2.2 Otimização e validação do método MEPS/LC-UV para análise simultânea dos antidepressivos mirtazapina, citalopram, paroxetina, sertralina e fluoxetina em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica;

2.3 Aplicação do método desenvolvido em amostras de plasma de pacientes idosos em terapia com os antidepressivos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes, padrões primários e equipamentos

- ⇒ Metanol grau HPLC, J.T. Baker;
- ⇒ Fosfato monobásico de sódio, J.T. Baker;
- ⇒ Fosfato dibásico de sódio, J.T. Baker;
- ⇒ Fosfato monobásico de potássio, Dinâmica Reagentes Analíticos;
- ⇒ Sulfato de amônio, Merck;
- ⇒ Padrão de fluoxetina > 97%, Sigma-Aldrich;
- ⇒ Moclobemida, Pfizer;
- ⇒ Padrões de paroxetina, citalopram, mirtazapina e diazepam, Roche;
- ⇒ Filtro Millipak[®] 40 0,22 µm Sterile Millipore;
- ⇒ Membrana HV (durepore) em PVDF 0,45 µm Millipore[™];
- ⇒ Balança GEHAKA modelo AG200;
- ⇒ pHmetro Ultra Basic - Denver Instrument;
- ⇒ Monodestilador 3000 N Brand;
- ⇒ Microseringa MEPS (250 µL, sorvente de fase mista: C8/trocador forte de cátions, 2mg), SGE Analytical Science.

As soluções padrão diluídas dos antidepressivos foram preparadas considerando o intervalo terapêutico, a partir da diluição de soluções estoque de 1mg mL⁻¹ em metanol. Estas soluções foram estocadas a 4°C e protegidas da luz. A estabilidade das soluções foi verificada periodicamente durante os ensaios.

A água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 MΩ cm⁻¹) utilizada nos ensaios deste trabalho foi purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore[®], Brasil). As soluções tampão foram preparadas mensalmente, armazenadas sob refrigeração e ao abrigo da luz.

3.2 Amostras de plasma branco de referência

As amostras de plasma branco de referência, livres dos fármacos em análise, e sorologia negativa para hepatites B e C, HIV, chagas, HTLV I/II, TGP e sífilis foram cedidas pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP.

3.3 Amostras de plasmas de pacientes

As amostras de plasmas de pacientes idosos em tratamento com os antidepressivos foram gentilmente cedidas pela Prof^ª. Dr^ª. Regina Helena Costa Queiroz do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Essas amostras foram coletadas segundo critérios estabelecidos pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

As amostras de plasma foram coletadas, após 12 horas da última administração dos medicamentos, dos pacientes em terapia com os fármacos, durante o período mínimo de duas semanas.

3.4 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em um Cromatógrafo Líquido (Shimadzu LC-20AT; Kyoto, Japan) equipado com um sistema controlador CBM-20A e um detector UV Varian (modelo 310, CA, USA).

A separação cromatográfica LC-UV (simultânea) dos fármacos foi realizada em coluna Lichrospher[®] 60 RP 18 - select B (5 µm, 125 mm x 4 mm), pré-coluna similar LiChroCART[®]4-4 (MERCK), com a fase móvel solução tampão fosfato de potássio

50 mmol L⁻¹ pH 4,5 e metanol (55:45, v/v), na vazão de 1 mL min⁻¹, à temperatura ambiente no modo isocrático.

3.5 Preparo das amostras de plasma

As amostras de plasma foram diluídas com solução tampão para minimizar o efeito da matriz. Diferentes volumes de plasma e soluções tampão (tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 4,0; 5,0 e 7,0 e tampão borato 50 mmol L⁻¹ pH 9,0) foram avaliados. A proporção entre o volume de amostra de plasma e solução tampão foi mantida constante em 1:1 (v/v).

3.6 Procedimento MEPS

A otimização das variáveis MEPS foi realizada, em triplicata, com amostras de plasma enriquecidas com solução padrão dos antidepressivos (500 ng mL⁻¹).

A microseringa MEPS (250 µL, sorvente de fase mista: C8/trocador forte de cátions, 2mg) foi doada pela SGE (Melbourne, Austrália). Este sorvente possui partículas irregulares, com uma média de tamanho de 50 µm e porosidade nominal de 60 Å.

Antes de usar o sorvente pela primeira vez, o mesmo foi condicionado manualmente com 250 µL de metanol, seguido de 250 µL de água. Posteriormente, amostra de plasma enriquecida com solução padrão dos fármacos foi diluída com solução tampão e manualmente aspirada através do sorvente e dispensada no mesmo frasco uma ou mais vezes (pré-concentração dos analitos). A fase sólida foi lavada uma vez com 100 µL de ácido fórmico 0,1% em água para remover proteínas e outros compostos interferentes. Os analitos foram desorvidos (eluídos) diretamente no sistema LC com fase móvel (150 µL).

O sorvente C8/SCX foi usado para múltiplas extrações. Para aumentar o tempo de vida da fase extratora, esta foi lavada 3 vezes com 250 µL de água seguido por 250 µL de solução aquosa de ácido fórmico (0,1%) e 250 µL de metanol, entre as extrações. Esta etapa permitiu,

além da minimização do efeito de memória, o condicionamento do sorvente para a extração seguinte.

A influência do pH da amostra na eficiência do processo MEPS foi o primeiro parâmetro avaliado. Para isso, diferentes valores de pH foram investigados: 4,0; 5,5; 7,0 e 9,0; com soluções tampão adequadas. A influência da força iônica foi avaliada pela adição de NaCl à amostra de plasma (0, 5 e 10%, m/m).

A etapa de lavagem foi também avaliada. A MEPS (C8/SCX) dos antidepressivos (pK_a 8,7-10,2) está baseada nas interações iônicas e hidrofóbicas. Portanto, as otimizações do pH da amostra e do solvente de lavagem (solvente fraco) influenciaram na eficiência da extração.

Para a avaliação das melhores condições de dessorção, foram investigados diferentes solventes (metanol, água, solução tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 4,0 e fase móvel) e números de etapas de dessorção.

Para avaliar a influência dos compostos endógenos na seletividade do método MEPS/LC padronizado, amostras de plasma branco de referência ou água enriquecidas com solução padrão dos analitos (200 ng mL⁻¹) foram submetidas a diferentes procedimentos (pré-tratamento), anteriores ao processo MEPS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Preparo das amostras de plasma

Diferentes volumes de amostra têm sido empregados nas análises por MEPS, variando de 50-500 μL [4-22], porém a influência do volume da amostra na eficiência de MEPS (recuperação) não tem sido descrita na literatura.

De acordo com os resultados obtidos (**Figura 3.3**), a eficiência do método MEPS/LC-UV aumentou com maiores volumes das amostras de plasma (acima de 800 μL), devido, provavelmente a maior massa dos analitos. No entanto, 400 μL de plasma foram selecionados para os ensaios subsequentes, o que contribuiu para minimizar o efeito da matriz e aumentar o tempo de vida do sorvente. Além disso, o volume de amostra selecionado possibilitou a análise dos antidepressivos no intervalo terapêutico.

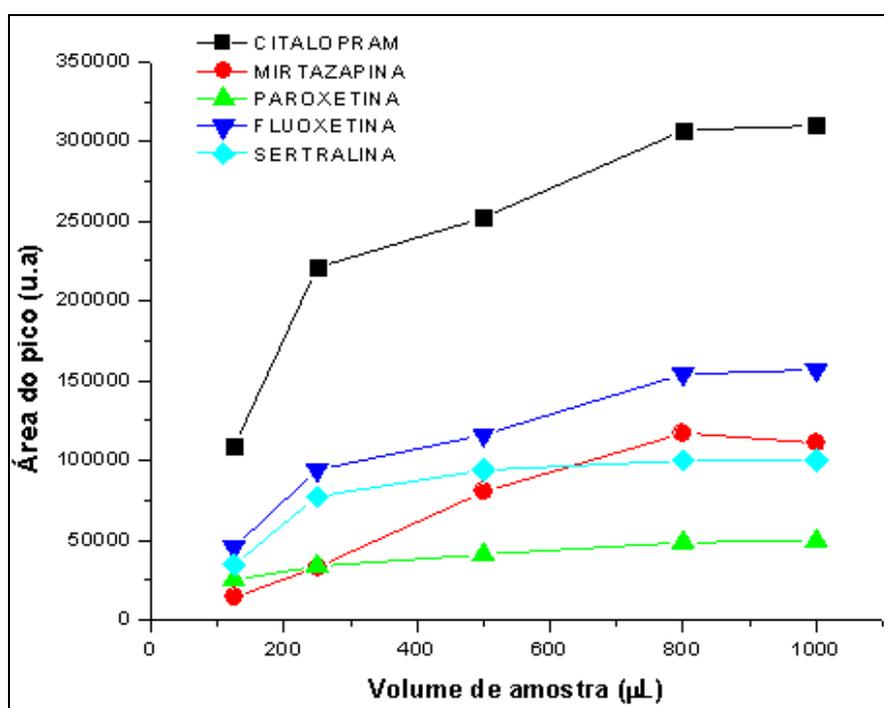


Figura 3.3 Efeito do volume de amostra de plasma (enriquecida com solução padrão dos fármacos na concentração de 500 ng mL^{-1}) diluída com solução tampão fosfato 50 mmol L^{-1} (pH 4,0; 1:1; v/v) na eficiência do MEPS/LC-UV ($n=3$).

4.2 Procedimento MEPS

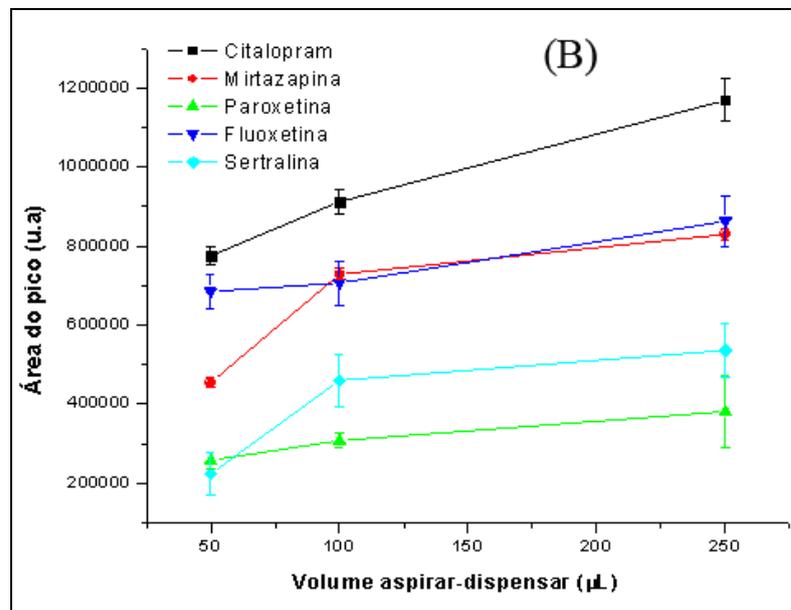
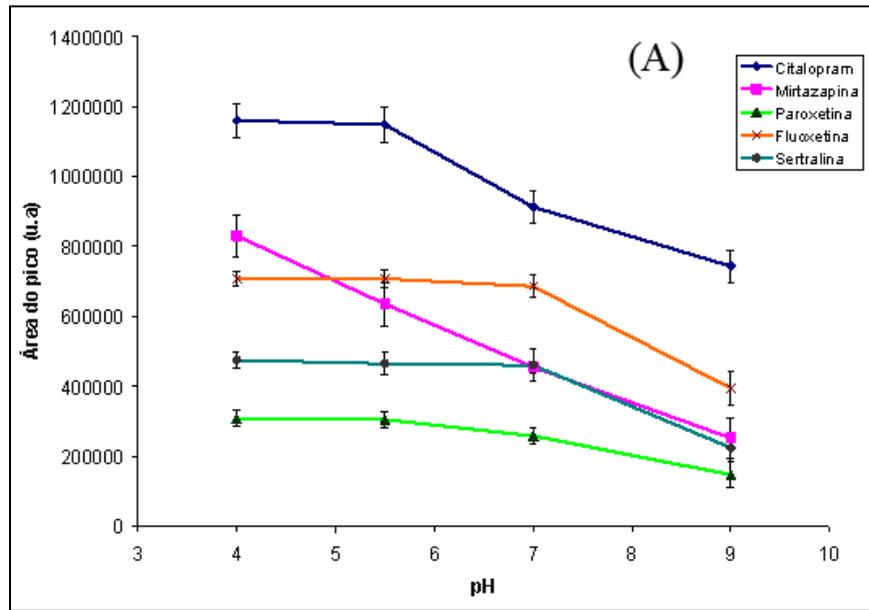
As variáveis MEPS, pH da amostra, força iônica, volume dos ciclos aspirar-dispensar e condições de dessorção foram otimizadas para estabelecer o equilíbrio de sorção em menor tempo de análise e obter sensibilidade analítica adequada para a determinação dos antidepressivos no intervalo terapêutico.

A diluição das amostras de plasma com solução tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 4,0 (**Figura 3.4A**) favoreceu a sensibilidade do método MEPS/LC-UV. Os antidepressivos encontram-se ionizados em pH 4,0; o que favoreceu a extração pela fase mista composta por C8 e trocador forte de cátions.

O volume de amostra aspirar-dispensar (50, 100 e 250 µL) foi avaliado para assegurar adequada eficiência do processo MEPS. Os melhores resultados foram obtidos com o volume de 250 µL de amostra diluída com solução tampão (**Figura 3.4B**).

A influência do número de ciclos de extração (aspirar-dispensar) na eficiência do processo de extração também foi investigada. A recuperação dos analitos aumentou linearmente de 1 a 3 ciclos de extração (**Figura 3.4C**). Consequentemente, as extrações seguintes foram realizadas com 3 ciclos de 250 µL de amostra. Para a análise dos antidepressivos em amostras de plasma, esta condição apresentou exatidão e precisão adequadas para fins de monitorização terapêutica.

A adição de NaCl às amostras de plasma diluídas com solução tampão aumentou a força iônica da solução, porém, reduziu a eficiência de MEPS (**Figura 3.4D**). Possivelmente, o sal interagiu com os fármacos em solução através de interações eletrostáticas ou pareamento iônico, diminuindo a transferência de massa para o sorvente.



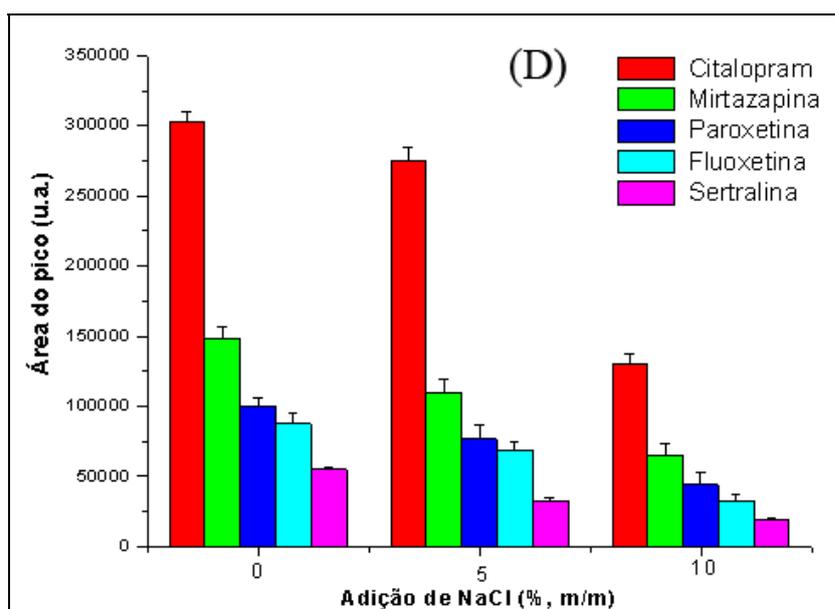
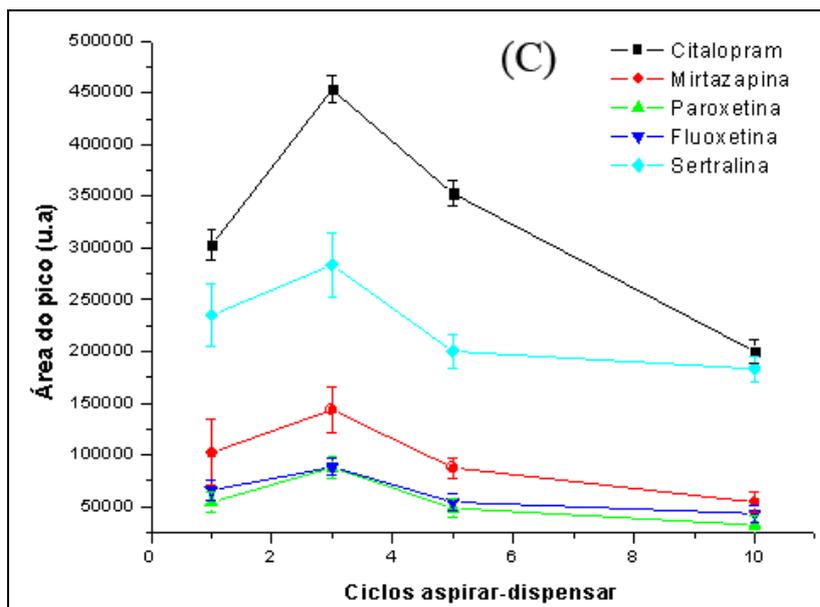


Figura 3.4 Otimização das variáveis MEPS: (A) efeito do pH das amostras de plasma diluídas com diferentes soluções tampão (fosfato e borato- pH 4,0; 5,5; 7,0 e 9,0); (B) efeito do volume da amostra aspirar-dispensar; (C) efeito dos ciclos aspirar-dispensar e (D) influência da força iônica na eficiência do método MEPS/LC-UV. Todos os ensaios foram realizados com 400 μL de amostra de plasma (enriquecida com solução padrão dos fármacos na concentração de 500 ng mL^{-1}) diluída com 400 μL de solução tampão e dessorção líquida dos antidepressivos com 150 μL de fase móvel ($n=3$).

A etapa de limpeza foi avaliada com diferentes solventes, eluição de interferentes com solvente fraco, com perda mínima dos antidepressivos. O uso de metanol na solução de lavagem resultou na perda dos fármacos. Dentre as soluções avaliadas, os melhores resultados foram obtidos com 100 μL de solução aquosa de ácido fórmico (0,1%).

As condições de dessorção (solvente e volume) foram avaliadas para garantir a eluição efetiva dos fármacos retidos no sorvente com o menor volume possível de solvente. Baseado nas interações iônicas, o pH do solvente de eluição deve estar 2 unidades acima dos valores de pK_a dos analitos. Porém, levando-se em consideração as interações hidrofóbicas, os solventes não-polares seriam suficientes para romper as forças que ligam os analitos ao sorvente. O sinal analítico aumentou proporcionalmente com o aumento do volume de solvente de eluição, o que possibilitou uma relação linear obtida entre 50-150 μL . Os melhores resultados foram obtidos com 150 μL de fase móvel (tampão fosfato de potássio 50 mmol L^{-1} pH 4,5 e metanol; 55:45, v/v), dentre os solventes de eluição avaliados (**Figura 3.5**).

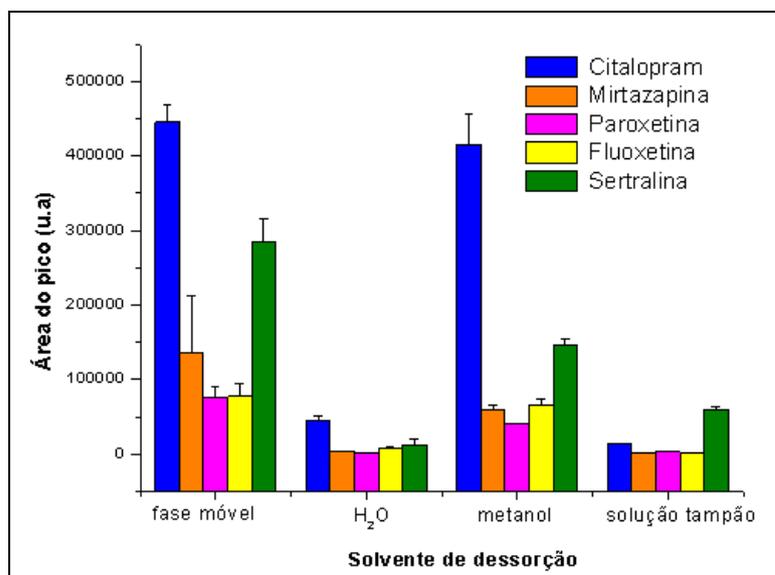


Figura 3.5 Efeito do solvente de dessorção na eficiência do processo MEPS. As análises MEPS/LC-UV foram realizadas com 400 μL de amostra de plasma (enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL^{-1}) diluída com 400 μL de solução tampão fosfato 50 mmol L^{-1} (pH 4,0) e 3 ciclos aspirar-dispensar (3x250 μL) e dessorção líquida dos fármacos com 150 μL de solvente (fase móvel, água, metanol e solução tampão fosfato pH 4,0) ($n=3$).

De acordo com Altun e Abdel-Rehim [3], o efeito de memória depende de muitos fatores, incluindo propriedades de adsorção dos analitos e sensibilidade analítica do detector. A pequena quantidade de fase sólida MEPS pode ser facilmente e efetivamente lavada entre as extrações, para minimizar o efeito de memória [3]. Desta forma, o sorvente foi lavado com 250 μL de água seguido por 250 μL de solução de ácido fórmico (0,1%) e 250 μL de metanol entre as extrações MEPS, para assegurar total eliminação de analitos e compostos endógenos retidos no sorvente MEPS.

Após a análise MEPS/LC de uma amostra de plasma enriquecida com 1000 ng mL^{-1} (LOQ máximo), o efeito de memória, ou seja, sinais analíticos nos tempos de retenção dos analitos foram menores que 1% dos obtidos para a concentração correspondente ao limite de quantificação.

Segundo os resultados obtidos, as melhores condições MEPS dentre as investigadas para análise de antidepressivos em amostras de plasma foram: 400 μL de plasma diluídos com 400 μL de solução tampão fosfato 50 mmol L^{-1} (pH 4,0), extração realizada com 3 ciclos aspirar-dispensar (3x250 μL), lavagem do sorvente com 100 μL de solução aquosa de ácido fórmico (0,1%), para remover proteínas e outros interferentes e por fim, dessorção líquida/injeção da amostra dos antidepressivos com 150 μL de fase móvel.

4.3 Efeito da matriz no procedimento MEPS e métodos para reduzir ruído da linha-base

Embora, as extrações MEPS, após a precipitação de proteínas das amostras de plasma com sulfato de amônio tenham resultado em cromatogramas com menor número de picos interferentes, o tempo requerido para este pré-tratamento (*clean up*) foi extenso, dificultando o uso da técnica MEPS para análise rotineira. Portanto, para simplificar o processo MEPS, as amostras de plasma foram diluídas com solução tampão. Este procedimento resultou em

método analítico seletivo, com exatidão e precisão adequados para análise dos antidepressivos em amostras de plasma, em concentrações que contemplem o intervalo terapêutico.

A adição de metanol à solução aquosa para a etapa de limpeza, anterior à eluição dos analitos, também resultou em cromatogramas livres de interferentes. Contudo, este procedimento diminuiu a eficiência do processo MEPS (recuperação) [14].

Para as análises de amostras de plasma, a precipitação das proteínas aumenta o tempo de vida dos cartuchos MEPS, podendo ser reutilizado cerca de 100 vezes sem qualquer redução na eficiência [1]. Neste trabalho, com a diluição das amostras de plasma com solução tampão, cada sorvente (microcoluna MEPS) foi reutilizado mais de 50 vezes para análises de amostras de plasma, com perda insignificante da eficiência da extração.

Segundo Abdel-Rehim, as amostras de plasma sem pré-tratamento podem obstruir os poros da fase extratora MEPS, diminuindo o número de reutilizações do cartucho para 20 vezes [1]. Os pré-tratamentos típicos, tais como: centrifugação, ajuste do pH, hidrólise e precipitação das proteínas diminuem a viscosidade da amostra e sorção dos compostos endógenos à superfície da fase sorvente, favorecendo a transferência de massa do analito.

Para avaliar a influência dos compostos endógenos na seletividade do método MEPS/LC padronizado, amostras de plasma branco de referência ou água enriquecidas com solução padrão dos antidepressivos (200 ng mL^{-1}) foram submetidas a diferentes procedimentos (pré-tratamento), anteriores ao processo MEPS.

A **Figura 3.6** ilustra os cromatogramas da análise MEPS/LC-UV de diferentes amostras enriquecidas com os antidepressivos: **(A)** água; **(B)** amostra de plasma branco de referência, após a precipitação das proteínas com solução saturada de sulfato de amônio; **(C)** amostra de plasma diluída com solução tampão fosfato (50 mmol L^{-1} ; pH 4,0; 1:1; v/v) e **(D)** amostra de plasma centrifugada.

De acordo com os cromatogramas, o procedimento de precipitação das proteínas resultou em um cromatograma com número menor de picos interferentes, com baixo ruído da linha base (**Figura 3.6B**), similar ao obtido com amostra de água (**Figura 3.6A**). Já o cromatograma obtido da análise de amostra de plasma centrifugado apresentou maior número de picos interferentes e ruído da linha base mais pronunciado (**Figura 3.6D**), quando comparado ao obtido com o da análise MEPS/LC-UV da amostra de plasma diluída com solução tampão fosfato (**Figura 3.6C**).

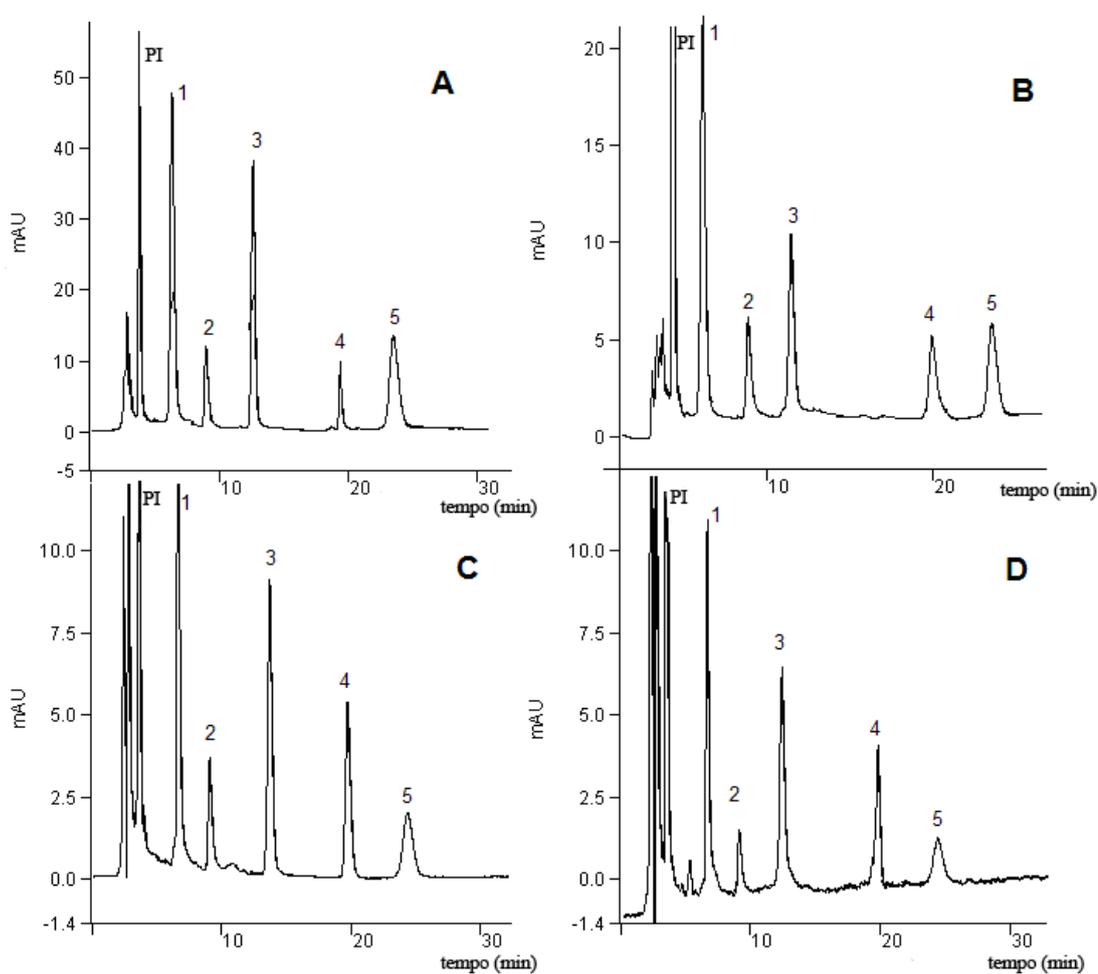


Figura 3.6 Influência dos compostos endógenos na seletividade do método MEPS/LC. Amostras enriquecidas com os antidepressivos (200 ng mL^{-1}) analisadas por MEPS/LC-UV. (A) amostra de água; (B) amostra de plasma após precipitação com solução saturada de sulfato de amônio; (C) amostra de plasma diluída com solução tampão fosfato 50 mmol L^{-1} pH 4,0 - 1:1 (v/v) e (D) amostra de plasma humano centrifugada. PI: padrão interno moclobemida (500 ng mL^{-1}); 1: Citalopram; 2: Mirtazapina; 3: Fluoxetina; 4: Paroxetina e 5: Sertralina.

4.4 Validação Analítica

A seletividade do método MEPS/LC-UV desenvolvido foi demonstrada pelos cromatogramas representativos de amostra de plasma branco de referência e amostra de plasma branco de referência enriquecida com os antidepressivos em concentração que contempla o intervalo terapêutico (**Figuras 3.7A e 3.7B**, respectivamente).

Estes cromatogramas evidenciam a capacidade do método em quantificar os antidepressivos na presença de compostos endógenos do plasma. Diferentes amostras de plasma branco de referência foram avaliadas e não foram detectados interferentes nos tempos de retenção dos fármacos avaliados.

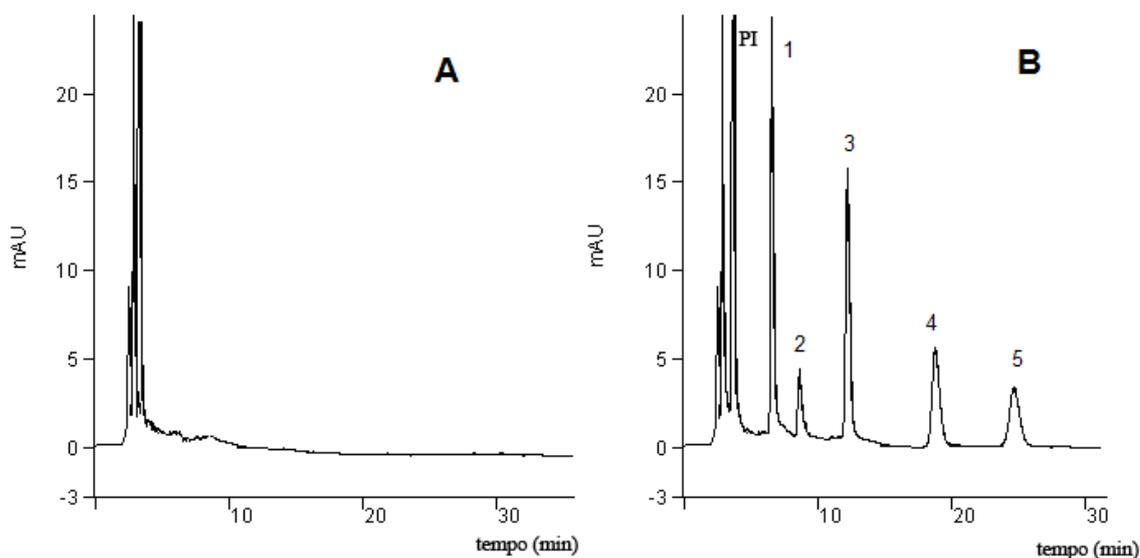


Figura 3.7 Cromatogramas MEPS/LC-UV de: **(A)** amostra de plasma humano branco de referência e **(B)** amostra de plasma humano branco de referência enriquecida com solução padrão dos antidepressivos (200 ng mL^{-1}). **PI**: padrão interno moclobemida (500 ng mL^{-1}); **1**: Citalopram; **2**: Mirtazapina; **3**: Fluoxetina; **4**: Paroxetina e **5**: Sertralina.

A linearidade do método MEPS/LC-UV foi determinada com amostras de plasma branco de referência enriquecidas com solução padrão dos antidepressivos na concentração do LOQ-1000 ng mL⁻¹. As equações das regressões lineares, os coeficientes de determinação correspondentes (r^2), bem como os valores de LOQ obtidos para os antidepressivos são apresentados na **Tabela 3.3**.

Tabela 3.3 Linearidade e limite de quantificação (LOQ) do método MEPS/LC-UV para análise de antidepressivos em amostras de plasma.

Antidepressivos	Regressão linear ^a (LOQ – 1000 ng mL ⁻¹)	r^2	LOQ (ng mL ⁻¹)
Mirtazapina	$y = 0,244 + 0,001 x$	0,998	25
Citalopram	$y = 0,0565 + 0,00194 x$	0,998	10
Paroxetina	$y = 0,267 + 0,001 x$	0,999	20
Sertralina	$y = 0,261 + 0,002 x$	0,998	10
Fluoxetina	$y = 0,628 + 0,001 x$	0,999	20

^a baseado em valores de áreas.

A técnica MEPS pode ser realizada tanto no modo manual quanto no automatizado, com diferentes técnicas de separação. No entanto, o modo manual tem apresentado menor repetitividade quando comparado ao processo automatizado, devido à dificuldade de manter exatamente as mesmas condições (como por exemplo, a vazão da passagem da amostra através do sorvente). Porém, o método desenvolvido neste trabalho apresentou precisão e exatidão adequados para fins de monitorização terapêutica.

A precisão interensaio e a exatidão do método MEPS/LC-UV foram determinados através da análise em replicatas ($n=5$) de amostras de plasma humano branco de referência enriquecidas com solução padrão dos antidepressivos em três diferentes concentrações (**Tabela 3.4**).

Tabela 3.4 Precisão interensaio (CV) e exatidão do método MEPS/LC-UV para análise de antidepressivos em amostras de plasma.

Antidepressivos	Concentração adicionada (ng mL ⁻¹)	CV (%) (n=5)	Exatidão (%) (n=5)
Citalopram	500	3,4	97
	125	6,2	95
	10	8,0	93
Mirtazapina	500	1,3	89
	125	2,7	88
	25	2,9	85
Paroxetina	500	2,3	87
	125	4,4	86
	20	6,9	84
Fluoxetina	500	3,0	97
	125	4,0	95
	10	8,7	92
Sertralina	500	3,1	97
	125	6,7	89
	20	4,1	86

Os valores dos coeficientes de variação (1,3 a 8,7%) obtidos neste trabalho são condizentes com os obtidos para a técnica MEPS no modo manual [3, 17]. O método desenvolvido apresentou exatidão, precisão e LOQ adequados para análise de antidepressivos em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica.

A repetitividade dos resultados MEPS/LC utilizando três diferentes microcolunas M1 também foi avaliada. Os resultados de exatidão e precisão foram similares para as diferentes microcolunas MEPS (**Tabela 3.5**).

Tabela 3.5 Exatidão e precisão (CV) do método MEPS/LC utilizando três diferentes microcolunas M1, para análises das amostras de plasma humano branco de referência enriquecidas com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL⁻¹.

Antidepressivos	Exatidão (n=5)			CV %		
	MC 1	MC 2	MC 3	MC 1	MC 2	MC 3
Citalopram	97	97	99	3,4	2,6	2,3
Mirtazapina	89	89	90	1,3	0,9	1,1
Fluoxetina	87	90	88	2,3	1,9	1,7
Paroxetina	97	104	98	3,0	2,4	2,6
Sertralina	97	101	100	3,1	2,7	2,9

MC: microcoluna.

A **Tabela 3.6** apresenta uma lista de possíveis compostos interferentes e respectivos tempo de retenção analisados pelo método desenvolvido, os quais podem ser administrados concomitantemente com os antidepressivos estudados neste trabalho.

Tabela 3.6 Tempo de retenção dos fármacos analisados pelo método MEPS/LC-UV como possíveis interferentes.

Fármacos	Tempo de retenção (min)
Ácido ascórbico	2,05
Primidona	3,43
Caféina	4,06
Fenacetina	4,22
Moclobemida (P.I.)^a	4,65
Diclofenaco	5,15
Diazepam	5,67
Propranolol	6,52
Fenobarbital	6,73
Citalopram	7,08
Clonazepam	7,33

Continua **Tabela 3.6...**

...Continuação da **Tabela 3.6.**

Fármacos	Tempo de retenção (min)
Carbamazepina	7,45
Fenitoína	7,61
Mirtazapina	8,92
Desipramina	9,57
Amitriptilina	11,33
Nortriptilina	11,87
Fluoxetina	12,14
Clomipramina	12,18
Paroxetina	19,50
Sertralina	24,05

^a **PI: padrão interno**

O método MEPS/LC-UV desenvolvido, quando comparado a outros métodos de microextração padronizados em nosso laboratório: SPME/LC-UV [23] e SBSE/LC-UV [24] apresenta as seguintes vantagens: menor tempo de extração (3 min), menor LOQ (exceto para citalopram) e menor coeficiente de variação, especialmente quando este parâmetro é comparado ao método SPME/LC-UV [23] (**Tabela 3.7**).

Tabela 3.7 Precisão interensaio (CV), limite de quantificação (LOQ) e tempo de extração para as análises MEPS/LC, SPME/LC [23] e SBSE/LC [24] de antidepressivos (500 ng mL⁻¹) em amostras de plasma.

Analitos	CV (%)			LOQ (ng mL⁻¹)			Tempo de extração (min)		
	MEPS	SPME	SBSE	MEPS	SPME	SBSE	MEPS	SPME	SBSE
Citalopram	3,4	7,9	4,3	25	25	10	3	45	45
Mirtazapina	1,3	7,3	7,4	10	50	40	3	45	45
Paroxetina	2,3	14,8	2,6	20	50	40	3	45	45
Fluoxetina	3,0	8,5	2,7	10	25	25	3	45	45
Sertralina	3,1	5,6	3,5	20	50	35	3	45	45

4.5 Aplicação clínica do método MEPS/LC-UV desenvolvido

O método desenvolvido foi utilizado para análises de amostras de plasma de pacientes idosos em terapia com os antidepressivos avaliados neste trabalho. A forma e a resolução dos picos dos fármacos são similares àqueles obtidos na análise de amostra de plasma branco de referência enriquecida com solução padrão dos antidepressivos. Não foi observado interferente nos tempos de retenção dos fármacos.

A **Figura 3.8** representa a análise MEPS/LC-UV de uma amostra de plasma de paciente idoso em terapia com Paxil[®]. A concentração de paroxetina determinada na amostra de plasma do paciente contempla o intervalo terapêutico preconizado [25].

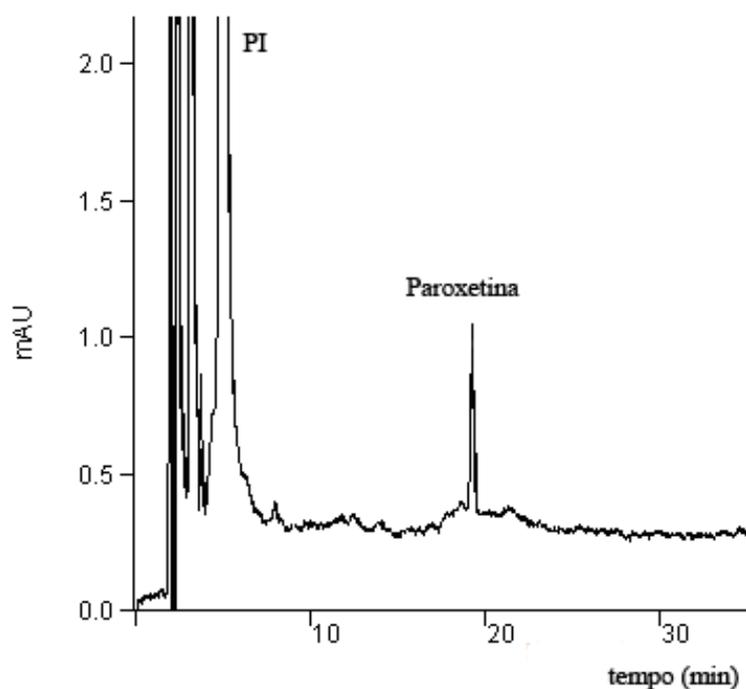


Figura 3.8 Análise MEPS/LC-UV de amostra de plasma de paciente idoso em terapia com Paxil[®]. A concentração de paroxetina determinada foi de 38 ng mL⁻¹.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método MEPS/LC-UV desenvolvido permitiu integração da dessorção dos analitos e injeção da amostra no sistema cromatográfico (LC-UV) em uma única etapa, usando a microseringa de extração MEPS. Além disso, esse método possibilitou a redução dos volumes das amostras (400 μL), do tempo de extração (3 min) e do consumo de solvente orgânico (150 μL de fase móvel: solução tampão fosfato de potássio 50 mmol L^{-1} pH 4,5; metanol - 55:45, v/v), quando comparado às técnicas comumente utilizadas para a determinação de antidepressivos em amostras de plasma.

A fase extratora MEPS, M1 (C8/SCX), foi reutilizada mais de 50 vezes em amostras de plasma diluídas com solução tampão, com perda mínima da eficiência da extração, comprovando a robustez do material sorvente.

Segundo os parâmetros de validação analítica avaliados, o método MEPS/LC-UV desenvolvido é adequado para a determinação de antidepressivos em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica, o qual foi aplicado com êxito em amostras de plasma de pacientes idosos em terapia com os antidepressivos estudados neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABDEL-REHIM, M. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2569-2580, 2010.
- [2] ABDEL-REHIM, M. Current Advances in Microextraction by Packed Sorbent (MEPS) for Bioanalysis Applications. **LC-GC Europe**, v. 22, p.8-18, 2009.
- [3] ALTUN, Z.; ABDEL-REHIM, M. Study of the factors affecting the performance of microextraction by packed sorbent (MEPS) using liquid scintillation counter and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 630, p. 116-123, 2008.
- [4] ABDEL-REHIM, M. New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 801, p. 317-321, 2004.
- [5] MORALES-CID, G.; CÁRDENAS, S.; SIMONET, B. M.; VALCÁRCEL, M. Direct automatic determination of free and total anesthetic drugs in human plasma by use of a dual (microdialysis-microextraction by packed sorbent) sample treatment coupled at-line to NACE-MS. **Electrophoresis**, v. 30, p. 1684-169, 2009.
- [6] ALTUN, Z.; M. ABDEL-REHIM, M.; BLOMBERG, L. G. New trends in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe (MEPS) for LC and GC applications Part III: Determination and validation of local anaesthetics in human plasma samples using a cation-exchange sorbent and MEPS-LC-MS-MS. **Journal of Chromatography B**, v. 813, p. 129-135, 2004.
- [7] ABDEL-REHIM, M.; DAHLGREN, M.; BLOMBERG, L. G. Quantification of ropivacaine and its major metabolites in human urine samples utilizing microextraction in a packed syringe automated with liquid chromatography tandem mass spectrometry (MEPS-LC-MS/MS). **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 1658-1661, 2006.
- [8] ABDEL-REHIM, M.; ANDERSSON, L. I.; ALTUN, Z.; BLOMBERG, L. G. Microextraction in packed syringe online with liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Molecularly imprinted polymer as packing material for MEPS in selective extraction of ropivacaine from plasma. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 29, p. 1725-1736, 2006.

- [9] ABDEL-REHIM, M.; ALTUN, Z.; BLOMBERG, L. G. Microextraction in packed syringe (MEPS) for liquid and gas chromatographic applications. Part II–Determination of ropivacaine and its metabolites in human plasma samples using MEPS with liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, 1488-1493, 2004.
- [10] KAMEL, M.; SAID, R.; ELBEQQALI, A.; BASSYOUNI, F.; ABDEL-REHIM, M. On-Line Determination of Cyclophosphamide in Blood Samples Utilizing Microextraction by Packed Sorbent and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (MEPS-LC-MS/MS). **The Open Spectroscopy Journal**, v. 3, p. 26-30, 2009.
- [11] SAID, R.; HASSAN, Z.; ABDEL-REHIM, M. Rapid and sensitive method for determination of cyclophosphamide in patients plasma samples utilizing microextraction by packed sorbent online with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (MEPS-LC-MS/MS). **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 31, p. 683-694, 2008.
- [12] ABDEL-REHIM, M.; HASSAN, Z.; SKANSEM, P.; HASSAN, M. Simultaneous determination of Busulphan in Plasma Samples by Liquid Chromatography-electrospray Ionization Mass Spectrometry utilizing Microextraction in Packed Syringe (MEPS) as On-line Sample Preparation Method. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, p. 3029-3041, 2007.
- [13] VITA, M.; SKANSEM, P.; HASSAN, M.; ABDEL-REHIM, M. Development and validation of a liquid chromatography and tandem mass spectrometry method for determination of roscovitine in plasma and urine samples utilizing on-line sample preparation. **Journal of Chromatography B**, v. 817, p. 303-307, 2005.
- [14] ABDEL-REHIM, M.; SKANSEM, P.; VITA, M.; HASSAN, Z.; BLOMBERG, L. G.; HASSAN, M. Microextraction in packed syringe/liquid chromatography/Electrospray tandem mass spectrometry for quantification of olomoucine in human plasma samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 539, p. 35-39, 2005.
- [15] CHAVES, A. R.; LEANDRO, 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.
- [16] EL-BEQALI, A.; KUSSAK, A.; ABDEL-REHIM, M. Determination of dopamine and serotonin in human urine samples utilizing microextraction online with liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 421-424, 2007.

- [17] SARACINO, M. A.; PALMA, A.; BONCOMPAGNI, G.; RAGGI, M. A. Analysis of risperidone and its metabolite in plasma and saliva by LC with coulometric detection and a novel MEPS procedure. **Talanta**, v. 81, p. 1547-1553, 2010.
- [18] EL-BEQQALI, A.; KUSSAK, A.; BLOMBERG, L.; ABDEL-REHIM, M. Microextraction in Packed Syringe/Liquid Chromatography/Electrospray Tandem Mass Spectrometry for Quantification of Acebutolol and Metoprolol in Human Plasma and Urine Samples. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, p. 575-586, 2007.
- [19] MORALES-CID, G.; CÁRDENAS, S.; SIMONET, B. M. Fully Automatic Sample Treatment by Integration of Microextraction by Packed Sorbents into Commercial Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Equipment: Application to the Determination of Fluoroquinolones in Urine. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 3188-3193, 2009.
- [20] JAGERDEO, E.; ABDEL-REHIM, M. Screening of Cocaine and Its Metabolite in Human Urine Samples by Direct Analysis in Real-Time Source Coupled to Time-of-Flight Mass Spectrometry After Online Preconcentration Utilizing Microextraction by Packed Sorbent. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, v.20, p. 891-899, 2009.
- [21] MIYAGUCHI, H.; IWATA, Y. T.; KANAMORI, T., TSUJIKAWA, K.; KUWAYAMA, K.; INOUE, H. Rapid identification and quantification of methamphetamine and amphetamine in hair by gas chromatography/mass spectrometry coupled with micropulverized extraction, aqueous acetylation and microextraction by packed sorbent. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 4063-4070, 2009.
- [22] EL-BEQQALI, A.; ABDEL-REHIM, M. Quantitative analysis of methadone in human urine samples by microextraction in packed syringe-gas chromatography-mass spectrometry (MEPS-GC-MS). **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 2501-2505, 2007.
- [23] SILVA, B. J. G.; QUEIROZ, R. H. C.; QUEIROZ, M. E. C. Simultaneous Determination of Nontricyclic Antidepressants in Human Plasma by Solid-Phase Microextraction and Liquid Chromatography (SPME-LC). **Journal of Analytical Toxicology**, v. 31, p. 313-320, 2007.
- [24] 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.
- [25] TOURNEL, G.; HOUDRET, N.; HÉDOUIN, V.; DEVEAUX, M.; GOSSET, D.; LHERMITTE, M. High-performance liquid chromatographic method to screen and quantitate

seven selective serotonin reuptake inhibitors in human serum. **Journal of Chromatography B**, v. 761, p. 147-158, 2001.