

CLAUDETE ALVES

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

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

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

São Carlos

2006

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

(Michael W. Smith)

**Dedico este trabalho a Deus.**

## **AGRADECIMENTOS**

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

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

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

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

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

**À FAPESP** pelo apoio financeiro e a bolsa concedida.

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

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

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

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

**À Ana Valéria**, pela amizade, apoio e cumplicidade.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*Aos funcionários da oficina mecânica, em especial aos Alex.*

*À CAPES E CNPq, pelo suporte financeiro.*

## RESUMO

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

## **ABSTRACT**

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

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 2

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

### Capítulo 3

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

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



<b>Figura 3.24</b> - Superfícies de respostas para os ACVs obtidos com a SPME para otimização da resposta (área dos picos) com a fibra PDMS/DVB (60 $\mu\text{m}$ ): (a) efeito do tempo com a temperatura, (b) efeito do pH com a temperatura, (c) efeito do pH com o tempo, (d) efeito do eletrólito (NaCl) com a temperatura, (e) efeito do eletrólito com o tempo e (f) efeito do eletrólito com o pH.	93
<b>Figura 3.22</b> - Gráfico do perfil de resposta gerado pelo software STATISTICA envolvendo os ACVs fenobarbital, fenitoína, carbamazepina e epóxido-carbamazepina para as condições otimizadas.	95
<b>Figura 3.23</b> - Cromatograma ilustrando uma extração obtida com o acoplamento SPME/LC, da mistura dos fármacos ACVs, na concentração de 10 $\text{mg L}^{-1}$ , em plasma. Fibra de PDMS/DVB (60 $\mu\text{m}$ ), tempo de extração (30 min.), temperatura (30 $^{\circ}\text{C}$ ), tampão fosfato de potássio 60 $\text{mmol L}^{-1}$ (pH 5,0), adição de NaCl (30 %) e com agitação de 1200 rpm. 1) fenobarbital; 2) epóxido-carbamazepina; 3) fenitoína; 4) carbamazepina; 5) hidantoína (padrão interno).	95
 <b>Capítulo 4</b>	
<b>Figura 4.1</b> - Diagrama esquemático da interface APCI (Ionização Química à Pressão Atmosférica).	102
<b>Figura 4.2</b> - Diagrama esquemático do mecanismo de funcionamento ESI-LC/MS.	104
<b>Figura 4.3</b> - Esquema ilustrativo de um analisador do tipo quadrupolo.	106
<b>Figura 4.4</b> - Esquema ilustrativo de um analisador do tipo "ion trap".	108
<b>Figura 4.5</b> - Esquema ilustrativo de um analisador do tipo "tempo de voo".	109
<b>Figura 4.6</b> - Espectro de massas (LC/MS- ESI) obtido para a DESI (SCAN) na concentração de (0,5 $\text{mg L}^{-1}$ ).	117
<b>Figura 4.7</b> - Espectro de massas (LC/MS- ESI) obtido para a NOR (SCAN) na concentração de (0,5 $\text{mg L}^{-1}$ ).	118
<b>Figura 4.8</b> - Espectro de massas (LC/MS- ESI) obtido para a IMI (SCAN) na concentração de (0,5 $\text{mg L}^{-1}$ ).	118
<b>Figura 4.9</b> - Espectro de massas (LC/MS- ESI) obtido para a AMI (SCAN) na concentração de (0,5 $\text{mg L}^{-1}$ ).	119
<b>Figura 4.10</b> - Espectro de massas (LC/MS- ESI) obtido para a CLOMI (SCAN) na concentração de (0,5 $\text{mg L}^{-1}$ ).	119
<b>Figura 4.11</b> - Diagrama de Pareto para os efeitos estimados das variáveis e suas interações para o planejamento fatorial $2^3$ ,+ ponto central e configuração estrela para os ADTs gerado através do software STATISTICA 6.0.	123
<b>Figura 4.12</b> - Superfícies de resposta para os ADTs utilizando a interface ESI no modo do íon positivo na concentração de 0,5 $\text{mg L}^{-1}$ : a) efeitos do capilar e da temperatura para a voltagem do cone de 14 V, b) efeitos da voltagem do cone e voltagem do capilar para a temperatura de 100 $^{\circ}\text{C}$ c) efeitos da voltagem do cone e da temperatura para a voltagem capilar de 1,32 kV.	125

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

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

