

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL MG

KATRINE KYONA MUNIZ SIRGOM DA SILVA

**EMPREGO DE POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR DE  
ACESSO RESTRITO PARA A EXTRAÇÃO DIRETA DE  
ANTIDEPRESSIVOS EM PLASMA HUMANO SEGUIDO DE ANÁLISE  
POR HPLC**

Alfenas/ MG

2014

KATRINE KYONA MUNIZ SIRGOM DA SILVA

**EMPREGO DE POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR DE  
ACESSO RESTRITO PARA A EXTRAÇÃO DIRETA DE  
ANTIDEPRESSIVOS EM PLASMA HUMANO SEGUIDO DE ANÁLISE  
POR HPLC**

Dissertação de pesquisa apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas. Orientador: Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo.

Alfenas/ MG

2014

Silva, Katrine Kyona Muniz Sirgom da.

Emprego de polímeros de impressão molecular de acesso restrito para a extração direta de antidepressivos em plasma humano seguido de análise por HPLC / Katrine Kyona Muniz Sirgom da Silva. - Alfenas, 2014.

89 f. -

Orientador: Eduardo Costa de Figueiredo.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Polímeros. 2. Cromatografia Líquida de Alta Pressão. 3. Antidepressivos. 4. Inibidores de Captação de Serotonina. 5. Fluoxetina. I. Figueiredo, Eduardo Costa de. II. Título.

CDD: 615.9

KATRINE KYONA MUNIZ SIRGOM DA SILVA


**EMPREGO DE POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR DE  
ACESSO RESTRITO PARA A EXTRAÇÃO DIRETA DE  
ANTIDEPRESSIVOS EM PLASMA HUMANO SEGUIDO DE ANÁLISE  
POR HPLC**

A banca examinadora abaixo assina e aprova a dissertação de pesquisa apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 29/07/2014.

Prof. Dr. Cristian Fernandes

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Assinatura: 

Prof. Dr. Pedro Orival Luccas

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL

Assinatura: 

Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL

Assinatura: 

## **AGRADECIMENTOS**

Ao final deste trabalho, sinto uma alegria e uma emoção enorme. Mal consigo acreditar que estou realizado um dos sonhos da minha vida. O início de um trabalho que parecia ser impossível agora finalizado. Esta trajetória só se tornou realidade devido à presença de algumas pessoas, então é com o coração feliz que agradeço:

Agradeço á Deus, que meu deu força, coragem e fé para acreditar que este trabalho seria possível.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo pela paciência, compreensão e principalmente por todo o conhecimento transmitido, por me proporcionar crescimento acadêmico, profissional e pessoal. Acredito que não terei palavras o suficiente para agradecê-lo.

Agradeço aos meus pais e aos meus irmãos pelo amor incondicional, por entenderem a minha ausência e mesmo assim me darem o apoio necessário para a realização deste sonho.

Agradeço ao meu namorado Anderson, por me apoiar e estimular sempre, por me levantar quando estou cansada e simplesmente por estar ao meu lado a cada dia.

Agradeço aos meus colegas do LAFT pela ajuda, e agradeço também a Técnica Patrícia Penido pela dedicação e conhecimento compartilhado.

Sem todos vocês, este trabalho não seria possível.

Muito Obrigada!

## RESUMO

Este trabalho versa sobre o desenvolvimento de um polímero de impressão molecular restrito à ligação com macromoléculas por meio de revestimento com albumina (RAMIP-BSA) para a extração direta de antidepressivos inibidores da receptação de serotonina (ISRS) em plasma humano em sistema cromatográfico multidimensional. A síntese do material foi realizada em três etapas. Primeiramente os sítios seletivos foram formados empregando síntese por precipitação e os seguintes reagentes: fluoxetina, ácido metacrílico, etileno glicol dimetacrilato, 2,2 – azo-isso-butironitrila, e metanol como, molécula modelo (MM), monômero funcional (MF), etileno glicol dimetacrilato como agente de ligação cruzada (ALC), iniciador radicalar (IR) e solvente, respectivamente. A segunda etapa consistiu na formação de uma camada hidrofílica pelo recobrimento químico da superfície do material com os monômeros hidrofílicos hidróxi etil metacrilato e glicidil metacrilato. Na terceira etapa o polímero foi revestido com albumina bovina utilizando glutaraldeído como agente de ligação cruzada, formando assim uma cápsula protéica ao redor das partículas. O RAMIP-BSA obtido foi capaz de excluir cerca de 99% das proteínas por ele percoladas, além de apresentar capacidade máxima adsortiva para fluoxetina de cerca de  $69 \text{ mg g}^{-1}$ , e comprovada seletividade à fluoxetina frente os outros fármacos ISRS. Uma coluna com o RAMIP-BSA foi empregada como fase extratora em um sistema de cromatografia líquida multidimensional para análise direta de ISRS em plasma humano. Foram construídas curvas de calibração para os fármacos venlafaxina (VEN), citalopram (CIT), fluvoxamina (FLUV), duloxetina (DUL), fluoxetina (FLUO) e sertralina (SER) utilizando um pool de plasma humano ( $n=6$ ) de indivíduos que não utilizam nenhum dos fármacos. Todas as curvas apresentaram  $r > 0,99$  na faixa linear de 20 a  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ . A precisão e exatidão foram avaliadas com base no desvio relativo do padrão e no erro relativo respectivamente. Os limites de detecção e quantificação foram de 10 e  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ . A recuperação absoluta foi de 85% à 93%. Todos os resultados estão de acordo com as normas do FDA mostraram-se aceitáveis de acordo com as normas do FDA.

**Palavras chave:** Polímeros. Cromatografia líquida de alta pressão. Antidepressivos. Inibidores da recaptção de serotonina. Fluoxetina.

## ABSTRACT

In this work, we developed a new restricted access molecularly imprinted polymer coated with albumin (RAMIP-BSA) for the direct extraction of antidepressants receiving serotonin inhibitors (SSRIs) in human plasma in a multidimensional chromatographic system. The synthesis of the material was performed in three steps. Firstly, the selective binding sites were formed by using fluoxetine, methacrylic acid, ethylene glycol dimethacrylate, 2-2'-azoisobutyronitrile, and methanol as template, functional monomer, cross linking agent, radical initiator and solvent, respectively. In the second step, the polymer was chemically covered with a hydrophilic layer by using the monomers hydroxyethyl methacrylate and glycidyl methacrylate. In the third step, the polymer particles were coated with an albumin capsule by using glutaraldehyde as cross linker. The obtained RAMIP-BSA was able to exclude about 99% of the proteins percolated through it, with a maximum adsorption capacity of 69 mg g<sup>-1</sup> for the fluoxetine, and good selectivity for the fluoxetine in comparison with other SSRIs. A RAMIP-BSA column was employed as extraction phase in a multidimensional liquid chromatography system for the analyses of SSRIs in human plasma samples. Validation calibration curves were constructed for venlafaxine (VEN), citalopram (CIT), fluvoxamine (FLUV), duloxetine (DUL), fluoxetine (FLUO) and sertraline (SER) using pooled human plasma (n=) individuals who do not use any of drugs. The analytical curves ranged from 20 to 500 mg L<sup>-1</sup>, with correlation coefficients larger than 0.99 for all the analytes. The precisions and accuracies (intra and inter-day) were evaluated as relative standard deviation and relative error, respectively. The limits of detection and quantification were 10 and 20 mg L<sup>-1</sup> for all the analytes. All the validation parameters are in accordance with the FDA recommendation.

**Keywords:** Polymers. High pressure liquid chromatography. Antidepressants. Serotonin reuptake inhibitors. Fluoxetine.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>4-VP</b>	4-Vinil piridina
<b>ADS</b>	Alquil diol sílica
<b>AIBN</b>	2,2'-azo-iso-butironitrila
<b>ALC</b>	Agente de ligação cruzada
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>BSA</b>	<i>Bovin serum albumin</i>
<b>CIT</b>	Citalopram
<b>DPR</b>	Desvio padrão relativo
<b>DUL</b>	Duloxetina
<b>EGDMA</b>	Etileno glicol dimetacrilato
<b>FDA</b>	Food and drug administration
<b>FLUO</b>	Fluoxetina
<b>FLUV</b>	Fluvoxamina
<b>GDMA</b>	Glicerol dimetacrilato
<b>GMA</b>	Glicidil metacrilato
<b>GMMA</b>	Glicerol monometacrilato
<b>HEMA</b>	2-hidroxietil metacrilato
<b>HPLC</b>	<i>High performance liquid chromatography</i>
<b>IR</b>	Iniciador radicalar
<b>LLE</b>	<i>Liquid-liquid extraction</i>
<b>MAA</b>	Ácido metacrílico
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>MF</b>	Monômero funcional
<b>MIP</b>	<i>Molecularly imprinted polymers</i>
<b>MM</b>	Molécula modelo
<b>n</b>	Número de amostras
<b>NIP</b>	<i>Molecularly non imprinted polymers</i>
<b>PAR</b>	Paroxetina
<b>RAM</b>	<i>Restricted access materials</i>
<b>RAMIP</b>	<i>Restricted access molecularly imprinted polymers</i>

<b>RAMIP-BSA</b>	<i>Restricted access molecularly imprinted polymers capped Bovin serum albumin</i>
<b>RANIP</b>	<i>Restricted access molecularly imprinted non polymers</i>
<b>RANIP-BSA</b>	<i>Restricted access molecularly imprinted non polymers capped Bovin serum albumin</i>
<b>SER</b>	Sertralina
<b>SPE</b>	<i>Solid phase extraction</i>
<b>USP</b>	<i>U. S. Pharmacopeial Convention</i>
<b>UV</b>	Ultra-violeta
<b>UV/vis</b>	Ultra-violeta/visível
<b>VEN</b>	Venlafaxina

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Esquema genérico da síntese do MIP.....	25
<b>Figura 2 -</b>	Esquema de um RAM com mecanismo de exclusão por barreiras físicas (A) e químicas (B).....	28
<b>Figura 3 -</b>	Esquema de síntese de um RAMIP-BSA.....	32
<b>Figura 4 -</b>	Representação esquemática do sistema de análise.....	33
<b>Figura 5 -</b>	Coluna recheada com RAMIP-BSA.....	38
<b>Figura 6 -</b>	Esquema utilizado para teste de eliminação de BSA nos polímeros sintetizados. O detector foi ajustado para 313 nm.....	40
<b>Figura 7 -</b>	Sistema multidimensional nas posições de amostragem (A), extração (B) e eluição (C).....	42
<b>Figura 8 -</b>	Estrutura química GDMA mistura de isômeros (A) e HEMA (B)..	47
<b>Figura 9 -</b>	Reações químicas envolvidas na cobertura do RAMIP com BSA.....	48
<b>Figura 10 -</b>	Espectros de infravermelho do RANIP-BSA, RAMIP-BSA e RAMIP.....	49
<b>Figura 11 -</b>	Micrografia eletrônica de varredura do RAMIP (A) e do RAMIP-BSA (B).....	50
<b>Figura 12 -</b>	Cromatograma obtido com respectiva área de 0,029684 para padrão de BSA 44 mg mL <sup>-1</sup> em sistema sem coluna e área de 0,029544 com coluna RAMIP-BSA.....	50
<b>Figura 13 -</b>	Cromatograma obtido com respectiva área de 0,029684 para padrão de BSA 44 mg mL <sup>-1</sup> em sistema sem coluna e com área de 0,029448 com coluna RANIP-BSA.....	51
<b>Figura 14 -</b>	Isoterma de adsorção do RAMIP-BSA frente á FLUO (n=3).....	53
<b>Figura 15 -</b>	Isoterma de Langmuir na adsorção de FLUO no RAMIP-BSA (n=3).....	54
<b>Figura 16 -</b>	Isoterma de Langmuir na adsorção de FLUO do RANIP-BSA (n=3).....	54
<b>Figura 17 -</b>	Isoterma de Freundlich na adsorção de FLUO no RAMIP-BSA (n=3).....	55
<b>Figura 18 -</b>	Isoterma de Freundlich na adsorção de FLUO no RANIP-BSA	

	(n=3).....	55
<b>Figura 19-</b>	Cromatograma obtido a partir da injeção de um pool de plasma misto de (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER representando os comprimentos de onda 229, 230, 238, 252 e 294 nm.....	58
<b>Figura 20-</b>	Influência do pH na fase de extração na resposta analítica.....	59
<b>Figura 21 -</b>	Cromatograma da injeção de padrão misto de (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER na concentração de 500 µg L <sup>-1</sup> empregando fase de extração com pH 2,0.....	60
<b>Figura 22 -</b>	Cromatograma da injeção de padrão misto de (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER na concentração de 500 µg L <sup>-1</sup> empregando fase de extração com pH 4,0.....	60
<b>Figura 23 -</b>	Cromatograma da injeção de padrão misto de (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER na concentração de 500 µg L <sup>-1</sup> empregando fase de extração com pH 6,0.....	61
<b>Figura 24 -</b>	Cromatograma da injeção de padrão misto de (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER na concentração de 500 µg L <sup>-1</sup> empregando fase de extração como pH 7,0.....	61
<b>Figura 25 -</b>	Cromatograma da injeção de padrão misto de (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER na concentração de 500 µg L <sup>-1</sup> empregando fase de extração com pH 8,0.....	62
<b>Figura 26 -</b>	Cromatograma da injeção de padrão misto de (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER na concentração de 500 µg L <sup>-1</sup> empregando fase de extração com pH 10,0.....	62
<b>Figura 27 -</b>	Influência do tempo de extração na resposta analítica.....	63
<b>Figura 28 -</b>	Influência do tempo de eluição na resposta analítica.....	64
<b>Figura 29 -</b>	Cromatograma da injeção de padrão misto de VEN, CIT, PAR (PI), FLUV, DUL, FLUO e SER na concentração de 500 µg L <sup>-1</sup>	

	empregando tempo de eluição de 25 s.....	65
<b>Figura 30 -</b>	Cromatograma da injeção de padrão misto de VEN, CIT, PAR (PI), FLUV, DUL, FLUO e SER na concentração de 500 µg L <sup>-1</sup> empregando tempo de eluição de 60 s.....	65
<b>Figura 31 -</b>	Cromatograma da injeção de padrão misto de VEN, CIT, PAR (PI), FLUV, DUL, FLUO e SER na concentração de 500 µg L <sup>-1</sup> empregando tempo de eluição de 100 s.....	63
<b>Figura 32 -</b>	Curva de calibração da VEN.....	67
<b>Figura 33 -</b>	Curva de calibração do CIT.....	68
<b>Figura 34 -</b>	Curva de calibração da FLUV.....	68
<b>Figura 35 -</b>	Curva de calibração da DUL.....	69
<b>Figura 36 -</b>	Curva de calibração da FLUO.....	69
<b>Figura 37 -</b>	Curva de calibração da SER.....	70
<b>Figura 38 -</b>	Cromatograma representando uma injeção de um pool de plasma humano branco (n=6).....	70
<b>Figura 39 -</b>	Cromatograma obtido pela injeção direta de um padrão misto de VEN, CIT, FLUV, DUL, FLUX e SER na concentração de 20 µg L <sup>-1</sup> (LiQ) e PAR (PI) na concentração de 300 µg L <sup>-1</sup> , em pool de plasma branco.....	71
<b>Figura 40 -</b>	Cromatograma obtido pela injeção direta de um padrão misto de VEN, CIT, FLUV, DUL, FLUX e SER na concentração de 150 µg L <sup>-1</sup> e PAR (PI) na concentração de 300 µg L <sup>-1</sup> , em pool de plasma branco.....	71
<b>Figura 41 -</b>	Cromatograma obtido pela injeção direta de um padrão misto de VEN, CIT, PAR (PI), FLUV, DUL, FLUX e SER na concentração de 300 µg L <sup>-1</sup> em pool de plasma branco.....	72
<b>Figura 42 -</b>	Cromatograma referente ao plasma de paciente que fazia uso de 75 mg por dia de VEN há 6 meses de tratamento.....	76
<b>Figura 43 -</b>	Cromatograma referente ao plasma de paciente que fazia uso de 20 mg por dia de CIT há 11 meses de tratamento.	77
<b>Figura 44 -</b>	Cromatograma referente ao plasma de paciente que fazia uso de 100 mg por dia de FLUV há 4 meses de	

	tratamento.....	77
<b>Figura 45 -</b>	Cromatograma referente ao plasma de paciente que fazia uso de 60 mg por dia de DUL há 5 meses de tratamento.....	78
<b>Figura 46 -</b>	Cromatograma referente ao plasma de paciente que fazia uso de 20 mg por dia de FLUO há 2 anos de tratamento.....	78
<b>Figura 47 -</b>	Cromatograma referente ao plasma de paciente que fazia uso de 50 mg por dia de SER há 8 meses de tratamento.....	79

**LISTA DE TABELA**

<b>Tabela 1 -</b>	Seletividade e seus respectivos resultados.....	57
<b>Tabela 2 -</b>	Faixa terapêutica dos fármacos.....	67
<b>Tabela 3 -</b>	Parâmetros de Validação intra-dias e seus respectivos resultados.....	73
<b>Tabela 4 -</b>	Parâmetros de Validação inter-dias e seus respectivos resultados.....	74
<b>Tabela 5 -</b>	Recuperação absoluta e seus respectivos resultados.....	75

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
2.1	ANTIDEPRESSIVOS INIBIDORES DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA (ISRS).....	17
2.1.1	Venlafaxina (VEN).....	17
2.1.2	Citalopram (CIT).....	18
2.1.3	Paroxetina (PAR).....	19
2.1.4	Fluvoxamina (FLUV).....	20
2.1.5	Duloxetina (DUL).....	21
2.1.6	Fluoxetina (FLUO).....	21
2.1.7	Sertralina (SER).....	22
2.2	POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR (MIPs).....	23
2.3	MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO (RAMs).....	26
2.4	POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR RESTRITOS À LIGAÇÃO COM MACROMOLÉCULAS (RAMIPs).....	29
2.5	CROMATOGRAFIA MULTIDIMENSIONAL.....	32
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
3.1	GERAL.....	34
3.2	ESPECÍFICOS.....	34
<b>4</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>35</b>
4.1	REAGENTES E EQUIPAMENTOS.....	35
4.2	SÍNTESE DO RAMIP-BSA.....	36
4.3	EMPACOTAMENTO DA COLUNA.....	38
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS.....	39
4.5	ESTUDO DE ELIMINAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS.....	39
4.6	ESTUDOS DE ADSORÇÃO.....	40
4.7	ESTUDOS DE SELETIVIDADE.....	40
4.8	MONTAGEM E OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA MULTIDIMENSIONAL.....	41
4.9	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	42

4.10	AMOSTRAS.....	44
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
5.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS .....	47
5.2	ESTUDOS DE ELIMINAÇÕES DE PROTEÍNAS.....	50
5.3	ISOTERMAS DE ADSORÇÃO.....	51
5.4	ESTUDOS DE SELETIVIDADE.....	56
5.5	OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA MULTIDIMENSIONAL.....	57
5.5.1	Composição e natureza da fase móvel.....	57
5.5.2	Comprimento de onda.....	58
5.5.3	pH da fase de extração.....	58
5.5.4	Tempos de extração.....	63
5.5.5	Tempos de eluição.....	64
5.6	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	66
<b>6</b>	<b>APLICAÇÃO DO MÉTODO NAS AMOSTRAS REAIS.....</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>88</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A depressão está entre as principais causas de suicídio na sociedade moderna<sup>1</sup>. Estima-se que cerca de 121 milhões de pessoas em todas as faixas etárias, incluindo crianças<sup>2</sup> e os idosos<sup>3, 4</sup> sofrem de depressão em todo o mundo, sendo este um problema de saúde pública que acomete aproximadamente 850.000 vidas todos os anos<sup>1</sup>.

Os principais sintomas da depressão são: humor deprimido, perda de interesse ou prazer, sentimentos de culpa, perda de energia, baixa auto estima, distúrbios do sono, baixo apetite e baixa concentração. Estes problemas podem se tornar crônicos ou recorrentes e levam a prejuízos substanciais na capacidade de um indivíduo para cuidar de suas responsabilidades diárias<sup>1</sup>.

Várias classes de fármacos são utilizados para tratamento deste transtorno como por exemplo: 1) antidepressivos tricíclicos (ADT), 2) antidepressivos inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS) e 3) antidepressivos inibidores da enzima monoaminaoxidase (IMAO), sendo os ISRS os mais utilizados atualmente, principalmente pela eficácia, tolerabilidade e segurança<sup>1</sup>.

Devido ao tratamento prolongado, ao seu uso generalizado e a variabilidade individual na resposta ao medicamento, análises quantitativas dos respectivos fármacos e de seus metabólitos presentes nos fluídos biológicos são frequentemente solicitadas no sentido de melhorar o ajuste da dose por meio da monitorização terapêutica. Contudo, devido ao alto teor de macromoléculas que estas matrizes apresentam, as metodologias convencionais que envolvem estas avaliações são normalmente difíceis e trabalhosas.

Neste caso a presença das proteínas apresenta-se como um complicado problema analítico devido à sua adsorção irreversível na fase estacionária da cromatografia, resultando em uma significativa diminuição na eficiência da coluna analítica, além de aumento na pressão interna do sistema a ponto de inutilizá-las<sup>5, 6</sup>. Sendo assim, a injeção direta desses fluidos biológicos não tratados em sistemas cromatográficos convencionais seria impossível, devido à incompatibilidade da

matriz biológica com a fase estacionária. Desta forma, o preparo de amostras é primordial antes de qualquer análise cromatográfica com vantagens para sistemas on-line onde a etapa de preparo da amostra é realizada no próprio equipamento. Este processo resulta em substancial diminuição nos erros analíticos e no tempo de análise, pois dispensa a etapa manual de tratamento das amostras<sup>5, 7</sup>.

Então, diversas estratégias têm sido desenvolvidas e soluções inovadoras têm sido propostas para esta finalidade, com destaque para a elaboração de materiais adsorventes específicos e capazes de purificar amostras complexas como os polímeros de impressão molecular (do inglês *molecularly imprinted polymers* - MIPs) e os materiais de acesso restrito (do inglês *restricted access materials* - RAMs).

Os MIPs são capazes de sequestrar seletivamente uma molécula<sup>8</sup> e apresentam vantagens como seletividade, estabilidade, baixo custo da preparação e amplo potencial de aplicação a diversas moléculas-alvo<sup>7</sup>. Já os RAMs são materiais capazes de reter diversos analitos de baixo peso molecular tendo como principal vantagem sua capacidade de eliminar macromoléculas como as proteínas e os polipeptídeos<sup>9</sup>.

Embora os MIP sejam dotados de seletividade, esses materiais são susceptíveis à ligação com macromoléculas, inviabilizando seu emprego em extração direta de fluidos biológicos. Já os RAM, embora eficientes na eliminação de macromoléculas, não apresentam reconhecimento molecular e por isso são pobres em seletividade. Dessa forma, um material que associa as características vantajosas de um MIP e de um RAM foi proposto por Haginaka et al (1999)<sup>10</sup>. Este material foi capaz de reter seletivamente uma molécula de interesse, eliminando quantitativamente as macromoléculas. Denominado polímero de impressão molecular restrito a ligação com macromoléculas (RAMIP), este polímero possui em sua configuração sítios específicos de reconhecimento molecular e grupos hidrofílicos externos que bloqueiam a ligação de macromoléculas<sup>10</sup>.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Serão tratados aqui os principais tópicos discutidos neste trabalho de acordo com levantamentos encontrados na literatura.

## 2.1 ANTIDEPRESSIVOS INIBIDORES DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA (ISRS)

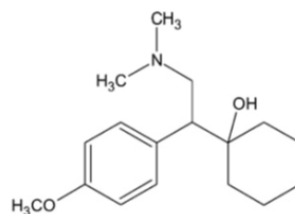
Os antidepressivos ISRS surgiram como um grande avanço terapêutico em psicofarmacologia, pois foram desenvolvidos para a inibição potente e seletiva da bomba de recaptação neuronal da serotonina em sinapses neuronais<sup>11</sup>, sendo utilizados no tratamento da depressão, ansiedade, e outros distúrbios neuropsiquiátricos<sup>12</sup>. Os ISRS exercem ações importantes sobre os neurotransmissores monoamínicos e seus receptores, em particular a serotonina<sup>13</sup>, que possui efeito inibidor e modulador geral da atividade psíquica, influenciando em quase todas as funções cerebrais através da inibição ou estimulação do ácido gama aminobutírico (GABA) e da modulação da homeostase entre dopamina e noradrenalina<sup>14</sup>. Por isso, sua deficiência implica em uma variedade de desordens no SNC<sup>12, 15</sup>.

As principais propriedades físico-químicas e farmacocinéticas do ISRS alvo de estudo neste trabalho são apresentadas a seguir.

### 2.1.1 Venlafaxina (VEN)<sup>16, 17, 18</sup>

#### a) Propriedades químicas

- Fórmula estrutural:



- Nome IUPAC: (*RS*)-1-[2-dimetilamino-1-(4-metoxifenil)-etil]cicloexan-1-ol

- Fórmula molecular: C<sub>17</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>2</sub>

- Massa Molar: 277, 402 g/mol

- pKa: 9,4

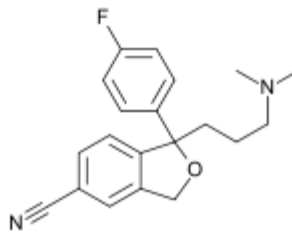
## b) Propriedades Farmacocinéticas

- Dose diária: 25 á 100 mg/dia
- Via (s) de administração: oral
- Concentração plasmática: 40 á 150  $\mu\text{g L}^{-1}$
- Biodisponibilidade: 45%
- Ligação as proteínas: 27%
- Metabolismo: extenso hepático
- Meia-vida: cerca de 5 horas (VEN), 11 horas (metabólito ativo)
- Excreção: renal

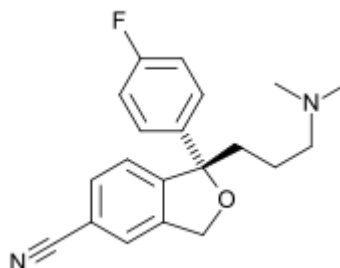
2.1.2 Citalopram (CIT)<sup>18, 19, 20</sup>

## a) Propriedades químicas

- Fórmula estrutural:



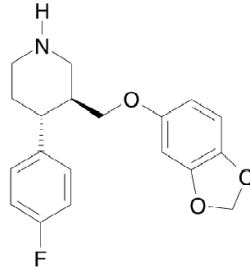
- Nome IUPAC: (R,S)-1-[3-(dimethylamino)propyl]-1-(4-fluorophenyl)-1,3-dihydroisobenzofuran-5-carbonitrile
- Fórmula molecular:  $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{FN}_2\text{O}$
- Massa molar: 324,39 g/mol
- pKa: 9,78
- Fórmula estrutural do enântiômero (S):



- b) Propriedades farmacocinéticas
- Dose Diária: 10 á 60 mg/dia
  - Via (s) de administração: via oral
  - Concentração plasmática: 20 á 200  $\mu\text{g L}^{-1}$
  - Meia-vida biológica: 35 horas
  - Biodisponibilidade: 80%
  - Ligação às proteínas:  $\pm 56\%$
  - Metabolismo: hepático
  - Excreção: renal

### 2.1.3 Paroxetina (PAR) <sup>16, 17, 18, 21</sup>

- a) Propriedades químicas
- Fórmula estrutural:



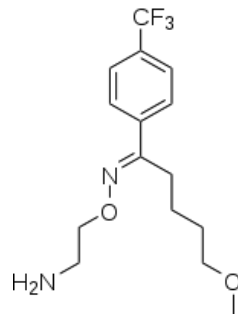
- Nome IUPAC: s (-)-trans-4R-(4'-fluorophenyl)-3S-[ (3',4'-methylenedioxyphenoxy) methyl] piperidine
  - Fórmula molecular:  $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{FNO}_3$
  - Massa Molar: 329,35 g/mol
  - pKa: 9,77
- b) Propriedades farmacocinéticas
- Dose diária: 20 á 50 mg/dia
  - Via (s) de administração: oral
  - Concentração plasmática: 10 á 150  $\mu\text{g L}^{-1}$

- Metabolismo: extenso metabolismo hepático
- Meia-vida biológica: 3 á 65 horas
- Ligação plasmática: 93 á 95%
- Excreção: renal e biliar

#### 2.1.4 Fluvoxamina (FLUV)<sup>17, 22</sup>

##### a) Propriedades química:

- Fórmula estrutural:



- Nome IUPAC: 5-metoxi-4'-(Trifluorometil) -valerophenone(E)-O-(2-amino-metil)-maleatooxima
- Fórmula molecular:  $C_{15}H_{21}F_3N_2O_2$
- Massa molar: 318.32 g/mol
- pKa: 8,7

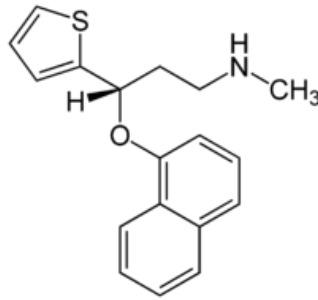
##### b) Propriedades Farmacocinéticas

- Dose Diária: 50 á 300 mg/dia
- Via (s) de administração: oral
- Concentração plasmática: 50 á 250  $\mu\text{g L}^{-1}$
- Biodisponibilidade: 84%
- Metabolismo: hepático
- Meia-vida biológica: 15,6 horas
- Ligação plasmática: 80%
- Excreção: renal

### 2.1.5 Duloxetina (DUL)<sup>17, 23</sup>

#### a) Propriedades químicas

- Fórmula estrutural:



- Nome IUPAC:(+)-(S)-N-metil-γ-(1-naftaleniloxi)-2-tiophenepropanamine

- Fórmula molecular: C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NOS

- Massa molar: 333.88 g/mol

- pKa: 9,34

#### b) Propriedades farmacocinéticas

- Dose diária: 30 á 120 mg/dia

- Via (s) de administração: oral

- Concentração plasmática: 40 á 130 µg L<sup>-1</sup>

- Biodisponibilidade: 77%

- Metabolismo: hepático

- Meia-vida biológica: 12,1 horas

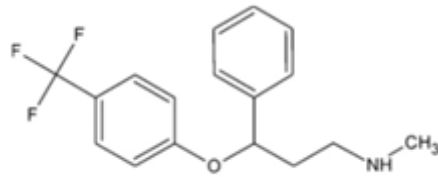
- Ligação plasmática: > 90%

- Excreção: renal

### 2.1.6 Fluoxetina (FLUO)<sup>17</sup>

#### a) Propriedades químicas

- Fórmula estrutural:



- Nome IUPAC: (±)-*N*-methyl-3-phenil-3- [4(trifluoromethyl) phenoxy] propan-1-amina

- Fórmula molecular:  $C_{17}H_{18}F_3NO$

- Massa Molar: 309 g/mol

b) Propriedades Farmacológicas

- Dose diária: 20 á 80 mg/dia

- Concentração plasmática: 50 á 500  $\mu\text{g L}^{-1}$

- Biodisponibilidade: 72%

- Metabolismo: hepático

- Meia-vida biológica: 1 á 3 dias (FLUO); 4 á 6 dias (metabólito ativo)

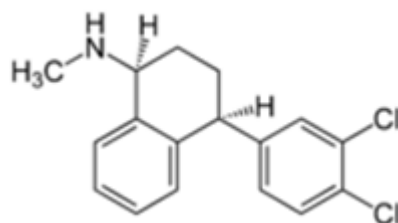
- Ligação plásmatica: 94.5%

- Excreção: 80% rins, intestino 15%

2.1.7 Sertralina (SER)<sup>17, 24</sup>

a) Propriedades químicas

- Fórmula estrutural:



- Nome IUPAC: (1S-cis)-4-(3,4-dichlorophenil)-1,2,3,4-tetrahidro-N-metil-1-naphthalenamina
- Fórmula molecular:  $C_{17}H_{17}Cl_2N$
- Massa molar: 306,23 g/mol
- pKa: 9,48

b) Propriedades farmacocinéticas

- Dose diária: 50 á 150 mg/dia
- Via (s) de administração: oral
- Concentração plasmática: 50 á 250  $\mu\text{g L}^{-1}$
- Biodisponibilidade: 44%
- Meia-vida biológica: 22 á 36 horas
- Ligação plasmática: 98 á 99%
- Metabolismo: hepático
- Excreção: renal

## 2.2 POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR (MIPs)

A natureza das interações químicas de reconhecimento molecular sempre despertou o interesse dos pesquisadores levando-os a buscar estes tipos de interações em materiais gerados artificialmente que possam ser capazes de interagir e reconhecer seletivamente moléculas em diversas aplicações<sup>25, 26</sup>. Através deste contexto, surgiu à ideia de produzir uma estrutura rígida tridimensional (um polímero) ao redor de uma molécula molde que pudesse efetuar seletivamente as interações moleculares e o reconhecimento molecular, ou seja, que pudesse atuar de forma similar a um anticorpo. Então, a partir desta concepção, surgiram os MIPs.

Os MIPs são materiais sintéticos, impressos molecularmente, rígidos e tridimensionais, sintetizados a partir de uma molécula alvo, capazes de se religar a esta molécula ou a classe dessas moléculas, pois possuem locais de reconhecimentos específicos<sup>27</sup>.

Os principais reagentes empregados na síntese dos MIPs são: monômeros funcionais (MFs), molécula modelo (MM), agente de ligação cruzada (ALC) e iniciador radicalar (IR); sendo a natureza química da MM, a razão molar entre MM e o MF, o tipo e volume de solvente, as quantidades de ALC e IR, o tempo e a temperatura de síntese as principais variáveis do sistema<sup>28</sup>.

O processo de síntese inicia-se com a formação do complexo entre o MF e a MM. Posteriormente, os MF são interligados quimicamente por meio de um agente de ligação cruzada (ALC), garantindo seletividade, rigidez, porosidade e estabilidade ao polímero. Geralmente se emprega um MF doador de próton (caráter ácido), quando a MM é aceptora de próton (caráter básico), ou vice-versa, sendo o ácido metacrílico e a 4-vinilpiridina os monômeros mais empregados, respectivamente<sup>29</sup>. A quantidade de MF empregada deve estar em excesso em relação a MM, para assegurar o deslocamento do equilíbrio no sentido de formação do complexo MM-MF<sup>27, 30</sup>.

A MM é o analito que será usado como molde na síntese do polímero, e sua interação com o MF é a base do reconhecimento molecular. A MM deve ser estável sob as condições de síntese (temperatura ou irradiação de UV) e solúvel no solvente utilizado. A remoção da MM da matriz polimérica forma lacunas (sítios de reconhecimento) que irão exibir afinidade pelo analito<sup>8, 29, 31</sup>.

Os MFs são espécies químicas responsáveis por formar os locais de ligação impressos no polímero. São escolhidos considerando sua capacidade de interagir com os grupos funcionais da MM. As ligações devem ser fortes o suficiente para permitir a formação do sítios de ligação, mas fracas o suficiente para facilitar a eluição da MM após a síntese. Os sítios formados são complementares ao analito alvo em tamanho, forma e funcionalidade<sup>27, 29</sup>.

O ALC é o responsável por interligar as cadeias poliméricas formadas por todos os MF a fim de formar o polímero<sup>29</sup>. Este interfere no controle da morfologia da matriz polimérica, estabiliza o sítio de ligação impresso, fornece estabilidade mecânica à matriz do polímero, favorece o aumento do número de cavidades efetivas e minimiza o número de cavidades com configuração não complementar à MM<sup>32</sup>.

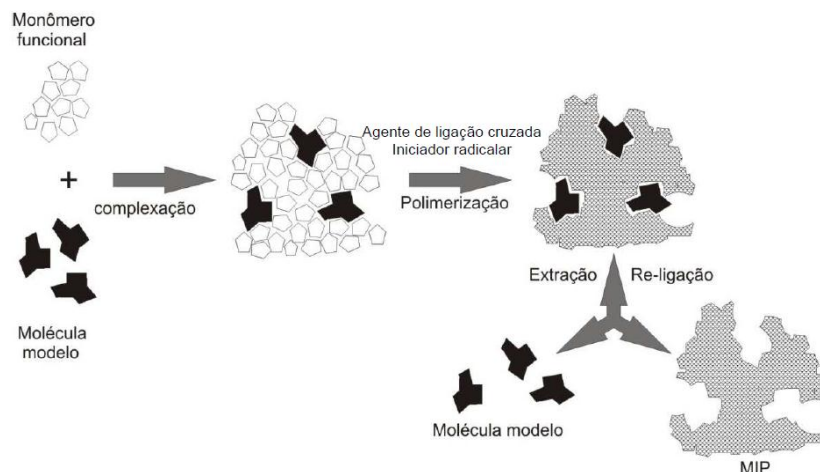
Para iniciar a polimerização deve-se adicionar o IR, que sofre uma quebra em sua estrutura (clivagem homolítica), através de um estímulo físico como radiação UV

ou aquecimento, gerando os radicais responsáveis pelo início da reação. O iniciador mais usado é 2,2'- azobisisobutironitrila (AIBN)<sup>30, 32</sup>.

A escolha do solvente também é um fator importante, pois ele é responsável por dissolver todas as substâncias envolvidas na síntese (MM, MF, ALC e IR), mas ao mesmo tempo, não pode interferir na formação do complexo MF-MM o que pode resultar na formação de sítios de ligação pouco seletivos e em pequeno número. O solvente determina também a morfologia e quantidade de poros, a área da superfície, além de contribuir para as interações da MM com o MF<sup>26, 29, 30, 33</sup>.

Na Figura 1 podemos observar o esquema genérico da síntese do MIP:

**Figura 1** - Esquema genérico da síntese do MIP.



**Fonte:** Adaptado do autor.

Existem quatro metodologias diferentes para se projetar um MIP. São elas: a) polimerização em bulk, b) por suspensão, c) por precipitação e d) por enxerto.

Na polimerização em bulk, a MM, o MF, o ALC e o IR são dissolvidos em um solvente apropriado e acondicionados em uma ampola de síntese num sistema homogêneo. Em seguida, o oxigênio é retirado utilizando argônio, nitrogênio ou mesmo ultrassom. A ampola é submetida a aquecimento ou radiação UV para iniciar o processo de síntese, resultando em polímeros de consistência rígida e heterogênea, sendo necessário proceder à moagem e o peneiramento dos mesmos antes do uso<sup>32</sup>.

A polimerização por precipitação diferencia-se da polimerização em bulk pelo aumento considerável de solvente que é empregado na dissolução dos reagentes (cerca de cinco vezes a mais). Em seguida a mistura é degaseificada e a

temperatura do sistema é aumentada para o início da polimerização. A síntese ocorre por um período de 24 h á 60 °C. A formação do MIP resulta da captura de oligômeros presentes na solução e a precipitação ocorre quando a microesfera adquire densidade maior que a solução<sup>26</sup>.

A polimerização por suspensão tem como objetivo a obtenção de materiais uniformes e esféricos. Os reagentes da síntese são dissolvidos em solvente orgânico sob agitação e a temperatura ambiente. Logo em seguida uma emulsão é formada e estabilizada pelo emprego de um tensoativo. Para o início da polimerização a temperatura do sistema é aumentada. Neste período as partículas do MIP vão sendo formadas permanecendo em suspensão com a fase dispersiva<sup>26</sup>.

A polimerização por enxerto utiliza um suporte polimérico de trimetilolpropano com poros esféricos de 5 a 10 mm para síntese do MIP. Os reagentes são dissolvidos e adicionados nos poros do suporte polimérico. Após este processo, a mistura é degaseificada e a síntese é realizada à temperatura de 60 °C por 4 h. Ao término da síntese se adiciona água, e em seguida é necessário uma forte agitação para que as microesferas do MIP sejam suspensas<sup>26</sup>.

Quanto à natureza da interação MM-MF, três abordagens diferentes são relatadas: a) covalentes, b) não-covalentes e c) semi-covalentes. A síntese covalente envolve a formação de ligações covalentes reversíveis entre a MM. Após a polimerização, a molécula modelo é retirada do polímero por clivagem das ligações correspondentes<sup>26, 27</sup>.

A síntese não covalente se baseia na formação de interações relativamente fracas não covalentes (ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, etc.) entre a MM e o MF selecionados antes da polimerização. Esta abordagem é, de longe, a mais usada para a preparação de MIP<sup>7, 27, 34</sup>. Finalmente a opção intermediária é denominada de semi-covalentes, na qual se tem a polimerização mediada por ligação covalente e a religação mediada por ligação não covalente<sup>26, 27</sup>.

## 2.2 MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO (RAMs)

O termo “materiais de acesso restrito” (RAM) foi introduzido por Desilets *et al* (1991)<sup>35</sup>, mas os primeiros trabalhos de absorventes que permitem a injeção direta

de matrizes biológicas foram realizados em 1985 por Pinkerton, sob o nome de materiais com superfície interna de fase reversa (ISRP)<sup>5</sup>.

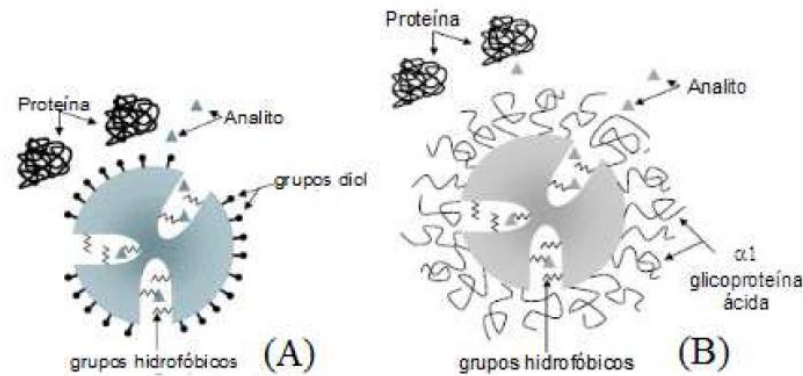
O desenvolvimento desses materiais permitiu uma dinamização nas análises que envolvem compostos orgânicos em matrizes complexas, devido à possibilidade de eliminação da etapa de pré-tratamento para eliminação de interferentes como macromoléculas (mais frequentemente proteínas), muitas vezes em maior quantidade que o analito de interesse. Os RAMs estão sendo usados principalmente na extração de substâncias com baixa massa molecular<sup>36</sup>, pois seu emprego em sistemas *on-line* tem permitido a injeção direta de amostras biológicas (sem tratamento prévio) no sistema de análise, tendo como principal mecanismo de extração a exclusão de macromoléculas por meios físicos ou químicos<sup>37</sup>.

Dentre as técnicas de injeção direta, as que utilizam fases do tipo RAM têm se destacado. Estas fases estacionárias combinam os princípios da Cromatografia de Exclusão e da Cromatografia de Fase Reversa, uma vez que sua superfície hidrofílica impede a adsorção de macromoléculas da matriz biológica na fase estacionária e suas propriedades hidrofóbicas são responsáveis pela retenção das micromoléculas.

O mecanismo de eliminação de macromoléculas se deve à presença de poros dotados de grupos hidrofóbicos (no interior do RAM) capazes de capturar moléculas de baixo peso molecular (barreira física)<sup>38</sup>. Por outro lado, a superfície externa dos RAM pode ser revestida com grupos hidrofílicos (barreira química), evitando assim a adsorção da matriz protéica. Desse modo, no momento da extração, os analitos de interesse (de baixo peso molecular) penetram nos poros e são retidos pelos grupos ligantes, enquanto que as macromoléculas são enviadas para o descarte sem que haja retenção das mesmas na coluna RAM<sup>39</sup>.

A Figura 2 mostra um RAM (com exclusão por barreira física) denominado de suporte de alquil-diol sílica - ADS (A) e um RAM (com exclusão por barreira química) denominado de superfície coberta por proteína - PCS (B).

**Figura 2** - Esquema de um RAM com mecanismo de exclusão por barreiras físicas (A) e químicas (B).



**Fonte:** Adaptado de Soverain, 2004<sup>6</sup>.

Os RAMs podem ser classificados de acordo com: a) sua superfície química, b) seu mecanismo de exclusão e c) sua aplicação analítica. As superfícies químicas consistem da presença de grupos hidrofóbicos nas superfícies internas e grupos hidrofílicos em seu exterior<sup>5, 6</sup>.

As fases de RAMs são denominadas unimodais e bimodais quando as superfícies interiores e exteriores têm as mesmas propriedades ou propriedades distintas, respectivamente. Dentre alguns exemplos de sorventes hidrofóbicos podemos citar: fase de alquil-diól sílica (ADS), superfície semipermeável (SPS), fase hidrofóbica blindada (SHP), fase de função mista (MFP), superfície interna de fase reversa (ISRP) e proteína revestida de sílica, disponíveis comercialmente ou de fácil preparo em laboratório, têm sido usadas para análises de xenobióticos em fluidos biológicos<sup>5, 40</sup>.

O mecanismo de exclusão desses sorventes é baseado nas barreiras de difusão físicas (com base no tamanho dos poros das partículas) e barreiras de difusão químicas que consiste na ligação do sorbente com as proteínas no lado de fora da partícula<sup>5</sup>.

As fases RAM têm aplicação analítica muito versátil, e podem ser utilizadas tanto no modo simples de análise como no modo multidimensional. No primeiro caso, a amostra biológica não tratada é injetada diretamente na coluna e, após exclusão das macromoléculas, os xenobióticos são analisados por eluição gradiente<sup>5, 40</sup>. Na cromatografia multidimensional, a coluna RAM é usada como pré-coluna e, após a eluição das macromoléculas, os analitos são transferidos para uma coluna analítica, utilizando-se uma válvula de comutação, onde são separados e

analisados (modo *on-line*)<sup>40</sup>. Os RAM também podem ser empregados em cartuchos para extração no modo *off-line*.

Uma modalidade eficiente de RAM consiste do revestimento externo da sílica modificada com albumina de soro bovino (BSA) por meio de reações de entrecruzamento<sup>41</sup>. Isso impede o acesso das macromoléculas hidrofílicas com o suporte. A sílica octadecil (C18) é muito utilizada como suporte e apresenta resultados significativos com relação à eliminação de macromoléculas. O método utilizado por Cassiano et al, (2006)<sup>41</sup> envolveu a injeção direta de plasma humano para uma superfície semipermeável (SPS) de coluna RAM.

Neste contexto, as fases do tipo RAM-BSA têm se destacado quanto à capacidade de exclusão das proteínas de matrizes complexas e de retenção de uma série de fármacos ácidos, básicos e neutros. A BSA é suficientemente hidrofílica e, através de interações repulsivas, exclui com eficiência as proteínas do plasma sem perda dos analitos de interesse.

### 2.3 POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR RESTRITOS À LIGAÇÃO COM MACROMOLÉCULAS (RAMIPs)

Os MIPs são materiais seletivos à MM ou à classe destas moléculas, e apresentam uma capacidade muito grande de reter macromoléculas, inviabilizando a injeção direta de fluídos biológicos. Já os RAMs, não retêm as macromoléculas, e são pobres em seletividade, adsorvendo basicamente qualquer molécula de baixo peso molecular. Com o objetivo de aliar as características vantajosas de ambos os materiais, Haginaka (1999)<sup>10</sup> propôs um material dotado simultaneamente de características dos RAMs e dos MIPs, denominado polímero de impressão molecular de acesso restrito (RAMIP). Esse material foi capaz de reter seletivamente o analito e rejeitar quantitativamente as macromoléculas, facilitando todo o procedimento analítico devido à diminuição do preparo tedioso e crítico da amostra.

Os RAMIPs apresentam sítios específicos de reconhecimento molecular e, ao mesmo tempo, grupos hidrofílicos externos que bloqueiam a ligação com proteínas. A camada hidrofílica na superfície externa do material proporciona um aumento do reconhecimento molecular em extrações em meios aquosos<sup>10, 42, 43, 44, 45, 46</sup>. Embora

sejam evidentes as vantagens dos RAMIPs no preparo de amostras, esta tecnologia ainda é pouco empregada devido à sua precocidade, e por isso torna-se um interessante campo de pesquisa para análise de fluidos biológicos<sup>347</sup>. Trabalhos encontrados na literatura descrevem algumas interessantes e pioneiras tecnologias que empregam estes materiais.

Haginaka e co-autores (1999)<sup>10</sup> desenvolveram RAMIPs seletivos a (S)-naproxeno, (S) ibuprofeno e propranolol, baseando em uma modificação da superfície externa do MIP. Os autores sintetizaram o MIP empregando os MF 4-vinilpiridina ou ácido metacrílico (MAA), e etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) como ALC. Na segunda etapa, os autores adicionaram uma mistura de glicerol dimacrilato (GDMA) e glicerol monometacrilato (GMMA) e uma camada hidrofílica foi formada em torno dos polímeros. O processo desta síntese resultou em RAMIPs com boa capacidade para eliminar macromoléculas, boa seletividade e sensibilidade quando foram utilizados para extração a partir de amostras biológicas pelo respectivo RAMIP.

Puoci e co-autores (2009)<sup>48</sup> também propuseram um RAMIP que foi sintetizado utilizando glicidil metacrilato como co-monômero hidrofílico. Os MIPs foram sintetizados pelo método de precipitação utilizando MAA como monômero funcional e *p*-aminofenol e cafeína como moléculas modelo. O co-monômero hidrofílicos foi adicionado antes do início de síntese, e o mesmo foi incorporado na rede polimérica. Após a polimerização, os anéis epóxi foram abertos pelo ácido perclórico, resultando numa camada hidrofílica de alta densidade (grupos hidroxila). Os RAMIPs mostraram um desempenho muito bom em termos de eliminação de proteínas e seletividade para a MM.

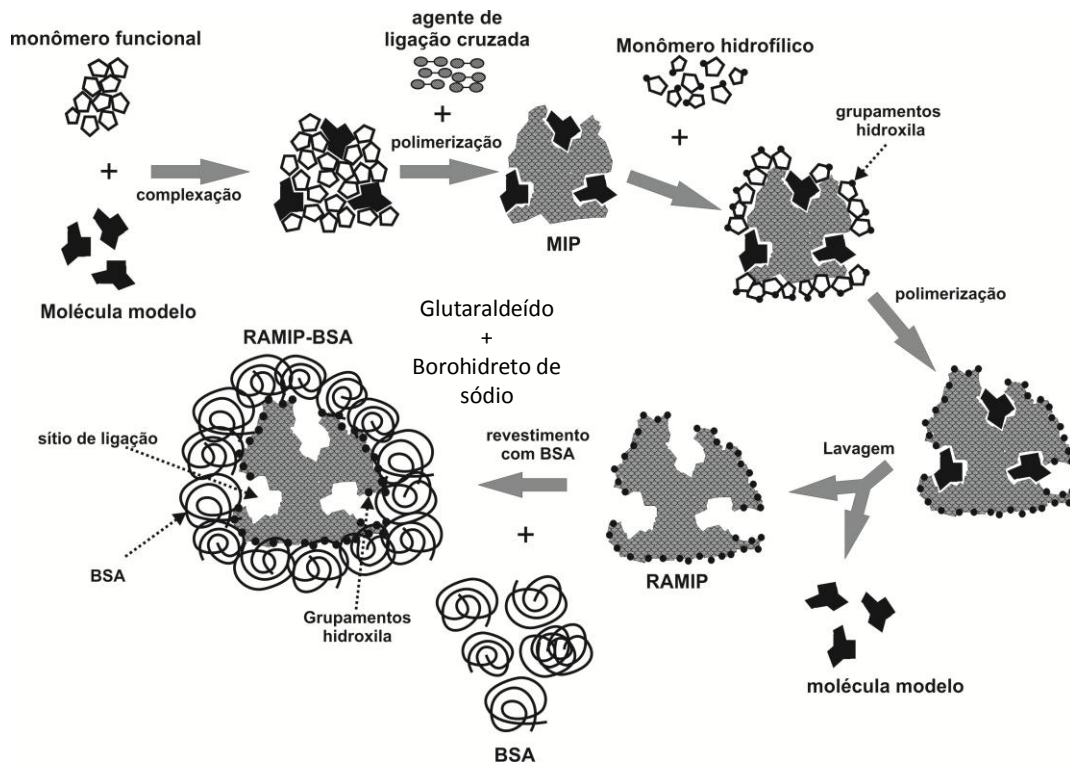
Hua et al., (2011)<sup>49</sup> sintetizaram um RAMIP com superfície modificada através de uma polimerização que consiste no emprego de partículas esféricas de poliestireno e hidrato de carbono para a formação de uma emulsão. O fenobarbital foi utilizado como MM. Logo em seguida, foi acrescentado 4-vinilpiridina como monômero funcional, etileno glicol dimetacrilato como agente de ligação cruzada e 2-hidroxietil metacrilato (2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosil) - (1-4) -2,2,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo como um agente de modificação de superfície (glicomonômero) que resultou em glicopolímeros. Após a síntese, foi realizada a alcoólise do glicopolímero, introduzindo metóxido de sódio em metanol e açúcar hidrófilo. O RAMIP desenvolvido apresentou boa seletividade para fenobarbital, em

comparação com o MIP não modificado. Isso demonstra que o tratamento de superfície não altera os sítios de reconhecimento do MIP. O RAMIP também foi incapaz de adsorver macromoléculas.

Como pode ser observado diante destes relatos, o revestimento protetor realizado com co-monômeros hidrofílicos era, até então, a única forma eficaz utilizada para se obter RAMIPs.

Em 2013, Moraes et al., (2013)<sup>50</sup> propuseram um novo conceito de RAMIP, denominado de polímero de impressão molecular restrito à ligação de macromoléculas por meio de revestimento com albumina (RAMIP-BSA). Trata-se de um RAMIP revestido com albumina sérica bovina (BSA), que foi empregado com sucesso na extração direta de compostos fenotiazínicos em plasma humano. Nesse caso, após a síntese do polímero, os autores o revestiram com uma camada de BSA empregando glutaraldeído como agente de ligação cruzada. Quando a extração de uma amostra proteica é conduzida nesse material em um pH diferente do ponto isoelétrico das proteínas (da amostra e do RAMIP-BSA), a repulsão eletrostática impede a aproximação das proteínas da amostra no RAMIP-BSA, promovendo assim a exclusão dessas proteínas. De acordo com os autores, a capacidade de eliminação das proteínas do material foi de 99,7 %, e a vida útil foi 90 injeções. O material também apresentou seletividade para fármacos da classe dos fenotiazínicos. A Figura 3 mostra o esquema de síntese desse material.

**Figura 3** - Esquema de síntese de um RAMIP-BSA



Fonte: Do autor, 2014.

## 2.4 CROMATOGRAFIA MULTIDIMENSIONAL

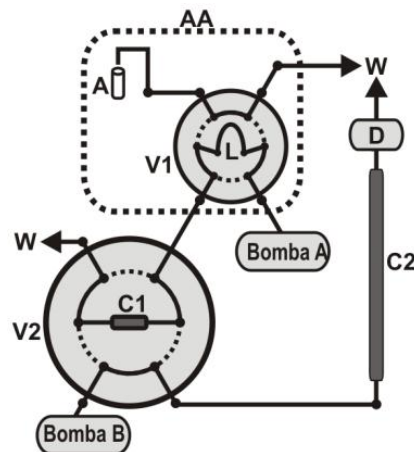
A cromatografia multidimensional consiste em uma técnica que permite a extração em fase sólida *on-line* e a análise direta a um sistema de HPLC. Esta técnica tem sido amplamente utilizada para a análise de amostras complexas, pois com este sistema é possível eliminar a fase de preparo da amostra, devido à sua capacidade de pré-tratamento e seletividade<sup>33</sup>.

A configuração deste sistema consiste em uma válvula de seis vias para acoplamento de colunas de extração e analíticas, bombas e detectores. Primeiramente, a amostra é inserida em uma coluna extratora através de um *looping* (para que haja um controle no volume da injeção) com um fluxo de fase móvel otimizados para a retenção dos analitos de interesse e eliminação de interferentes. Ao mesmo tempo, a coluna analítica é ajustada para eluição da fase móvel. Em seguida, a válvula é acionada e a fase móvel retira os analitos da coluna de extração e os envia para a coluna analítica de separação<sup>33</sup>. A válvula volta a sua posição

inicial, e os analitos são separados na coluna analítica e enviados ao detector. Ao mesmo tempo, a coluna de extração é reequilibrada com fase móvel para que o sistema esteja pronto para a injeção da amostra seguinte<sup>33, 37</sup>. É importante ressaltar que as duas bombas devem estar ligadas sendo que uma impulsiona a amostra para a coluna extratora e a outra impulsiona a fase móvel em direção a coluna analítica.

As vantagens desta técnica são: menor consumo de solventes, eliminação dos interferentes no momento do preparo da amostra, pré-concentração e diminuição no tempo da análise. Na Figura 4 pode-se observar uma configuração básica do sistema multidimensional.

**Figura 4** - Representação esquemática do sistema de análise



**Fonte:** Adaptado do autor, 2014.

**Nota:** A: amostra, AA: auto - amostrador, L: loop de amostragem, C1: coluna RAMIP-BSA, C2: coluna analítica, V1 e V2: válvulas 1 e 2, D: detector, W: descarte. As linhas tracejadas indicam as posições alternativas das válvulas.

### 3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

#### 3.1 GERAL

Sintetizar e avaliar o desempenho de um RAMIP-BSA na extração de fármacos antidepressivos ISRS em amostras de plasma humano por injeção direta em um sistema de cromatografia líquida multidimensional.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) Sintetizar RAMIP-BSA empregando fluoxetina como MM;
- b) Caracterizar os materiais obtidos por meio de estudos de adsorção, microscopia eletrônica de varredura, infravermelho e análise térmica;
- c) Avaliar o desempenho do RAMIP-BSA em termos de seletividade e capacidade de eliminação de macromoléculas;
- d) Otimizar os parâmetros de extração e as condições cromatográficas para extração e análise de fármacos antidepressivos ISRS em amostras de plasma humano;
- e) Validar as metodologias de acordo com as recomendações do FDA (Method Validation of U.S Food and Drug Administration)<sup>51</sup>;
- f) Avaliar a potencialidade do sistema para a quantificação dos fármacos em amostras reais.

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

Os reagentes e equipamentos em que consiste a parte experimental deste trabalho estão detalhados a seguir.

### 4.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

As sínteses dos polímeros foram realizadas empregando phmetro (Quimis Q400A, Brasil), balança analítica (Shimadzu, Tóquio, Japão), chapa aquecedora com sistema de agitação Q313I, (Quimis, Diadema, Brasil), tamises de várias malhas, balão de vidro com três bocas, condensador, rolha de borracha e termômetro. Os reagentes empregados foram MAA 99%, EGDMA 98%, AIBN, HEMA 97% e GDMA (mistura de isômeros)- todos adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

Para a limpeza dos polímeros utilizou-se um funil de Büchner, um sistema de vácuo tipo Manifold, bomba à vácuo (Millipore, Bedford, EUA ), banho de ultrassom (Unique, Indaiatuba, Brasil), centrífuga NT-811 (Nova Técnica, Piracicaba, ,Brasil), estufa 310/1 (Fanem, Bangalore, Índia ). Foram utilizados os seguintes solventes (grau HPLC): metanol, acetonitrila, diclorometano, ácido acético e álcool etílico (Vetec, Duque de Caxias, Brasil), acetona (Muskegon, EUA).

Ácido clorídrico e hidróxido de sódio foram adquiridos da Vetec e o ácido oxálico da QEEL (São Paulo, Brasil).

Para a construção das isotermas de adsorção utilizou-se agitador de tubos 251 (Fanem, Bangalore, Índia) e tubos de ensaio. Uma solução estoque de cloridrato de fluoxetina de 10.000 mg L<sup>-1</sup> e tampão fosfato pH 6,0, a 0,05 mol L<sup>-1</sup> foram empregados para o teste.

Para o recobrimento do RAMIP utilizou-se BSA adquirida da Becton, Dickinson and Company Sparks (Franklin Lakes, EUA), bem como glutaraldeído 25% e borohidreto de sódio 98%, ambos adquiridos da Vetec.

Todas as soluções foram preparadas empregando-se água ultra-pura, proveniente de um sistema de purificação de água Milli-Q® (Millipore®, Bedford, EUA), com resistividade de 18,2 MΩcm.

Os padrões de cloridrato de fluoxetina (96,2%) (FLUO), cloridrato de venlafaxina (97,5%) (VEN), cloridrato de duloxetina (93%) (DUL), cloridrato de citalopram (98,2%) (CIT), cloridrato de paroxetina (95%) (PAR), fluvoxamina (97,8%) (FLUV) e cloridrato de sertralina (98,6%) (SER) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Uma solução estoque para cada padrão foi preparada em metanol na concentração de 200 mg L<sup>-1</sup> e armazenada em frasco âmbar sob-refrigeração de 2 à 8 °C. Estas soluções foram empregadas para o preparo das amostras de plasma enriquecidas com os respectivos analitos nas concentrações de 20, 40, 80, 150, 300 e 500 µg L<sup>-1</sup>, contemplando as faixas terapêuticas de todos os fármacos em estudo<sup>16, 17, 19, 20, 22, 23, 24</sup>.

Os padrões de calibração foram preparados pipetando-se alíquotas de soluções estoque ou intermediárias em um béquer de fundo afunilado. As alíquotas foram secas sob fluxo de nitrogênio e ressuspensas em um volume adequado de um pool de plasma humano (n=6) de indivíduos que não utilizavam os respectivos fármacos em estudo.

O sistema de cromatografia líquida multidimensional foi composto por duas bombas (Shimadzu® 20AD, Tóquio, Japão), uma válvula de acionamento manual de seis vias modelo 7725i (Shimadzu®, Tóquio, Japão), uma válvula de acionamento eletrônico de seis vias modelo 11R-0016H (Valco Instruments®, Houston, EUA), uma coluna analítica (C18 250 × 4.6 mm, 5 µm Phenomenex®, Torrance, EUA) e um detector UV modelo SPD-20A (Shimadzu®, Tóquio, Japão). O “software” de controle foi desenvolvido em nosso laboratório em linguagem Visual Basic®. A fase móvel empregada na separação cromatográfica foi tampão acetato de sódio 0,2 mol L<sup>-1</sup> pH 4,5, acetonitrila e metanol na proporção de 60:37:3 (v/v/v).

## 4.2 SÍNTESE DO RAMIP-BSA

A síntese de um RAMIP-BSA foi realizada pelo método de precipitação, com base no trabalho de Moraes et al. (2013)<sup>50</sup>. Desta forma os reagentes utilizados na

primeira etapa foram: 1 mmol de MM (FLUO); 3 mmol de MF (MAA); 25 mg de IR (AIBN); 7 mmol de ALC (EGDMA) e 50 mL de metanol. Esses reagentes foram colocados no frasco reacional e borbulhados com nitrogênio por 20 min para a retirada do oxigênio. A reação foi então processada durante 60 min. Iniciando-se a segunda etapa foram adicionados os seguintes reagentes à mistura reacional: 7,5 mmol de HEMA, 0,5 mmol de GDMA e 50 mL de metanol. A síntese foi então processada por 24 h a 60 °C, em um balão de fundo redondo com três bocas sobre uma chapa aquecedora com sistema de agitação. Em uma boca do balão colocou-se um termômetro para controle da temperatura da reação, na outra boca um condensador de bolas circulando água para evitar perda de solvente, e na terceira um septo por onde foi feita a purga com nitrogênio para retirada de oxigênio e também a adição de reagentes durante o processo de síntese.

Após a síntese, o material foi colocado em um funil de Büchner e 300 mL de metanol foram percolados. O material foi seco a 45 °C por 24 h. No dia seguinte o polímero foi colocado em um cartucho vazio de SPE, acoplado em um “Manifold” e lavado para retirada da MM. A lavagem foi executada percolando-se sequencialmente pelo polímero as seguintes soluções: a) 50 mL de metanol, b) 100 mL de HCL 0,01 mol L<sup>-1</sup>, c) 100 mL de água milli-Q e d) 60 mL de metanol. Em seguida, foram percolados: a) 50 mL de diclorometano, b) 200 mL de metanol e c) 50 mL de água. Como o polímero ainda apresentava resíduos de FLUO, uma lavagem em ultrassom foi executada em três ciclos de uma hora. As soluções utilizadas em cada ciclo foram: a) 60 mL metanol:ácido acético 8:2- v/v; b) 30 mL metanol e c) 60 mL água milli-Q. A eficiência da lavagem foi comprovada, através da análise (por HPLC) da solução oriunda da última lavagem que não apresentou sinal algum de FLUO.

Em seguida, o polímero foi recoberto com BSA para melhorar a capacidade do material em eliminar macromoléculas. Foram adicionados 300 mg de RAMIP em um cartucho vazio de SPE que foi acoplado ao “Manifold”. A reação ocorreu percolando-se inicialmente 20 mL de uma solução BSA 1% (m/v) preparada em tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup> com pH 6,0, a uma vazão de 5 mL/ min. Em seguida, foram adicionados no cartucho 5 mL de glutaraldeído 25% (v/v) sendo o mesmo mantido em repouso por 5 h a temperatura ambiente. O glutaraldeído foi então retirado, sendo finalmente percolados 10 mL de borohidreto de sódio 1% (m/v) à uma vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>.

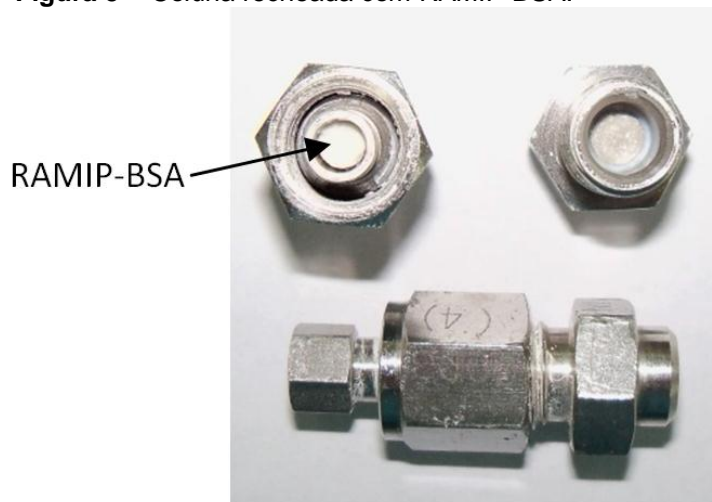
Após o revestimento, o polímero de impressão molecular restrito à ligação de macromoléculas por superfície recoberta com proteína (RAMIP-BSA) foi obtido. O mesmo foi lavado com água em abundância para a retirada de resíduos da síntese. Para garantir a homogeneidade do revestimento, o polímero foi agitado durante esta etapa pela extremidade superior do cartucho de SPE, com o auxílio de um bastão de vidro.

Um polímero não impresso restrito à ligação de macromoléculas por superfície recoberta com albumina (RANIP-BSA) também foi sintetizado da mesma forma, mas com a ausência da MM.

#### 4.3 EMPACOTAMENTO DA COLUNA

Os polímeros obtidos foram acondicionados em uma coluna de aço inoxidável pelo método “*slurry*”, utilizando água como solvente<sup>52</sup>. A coluna foi acoplada a um manifold para o empacotamento. Foi retirado o frit da entrada do fluxo, fazendo com que as partículas de polímero atravessassem toda a extensão da mesma, depositando-se gradativamente do final para o início da coluna (no sentido do fluxo). A suspensão empregada foi preparada adicionando 30 mg de RAMIP-BSA ou RANIP-BSA em 5 mL de água. As colunas foram então avaliadas quanto às suas capacidades de eliminar macromoléculas. A Figura 5 mostra a pré-coluna recheada com RAMIP-BSA.

**Figura 5** - Coluna recheada com RAMIP-BSA.



**Fonte:** Do autor, 2014.

**Nota:** A coluna tem 1 cm de comprimento e 4mm de diâmetro

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS

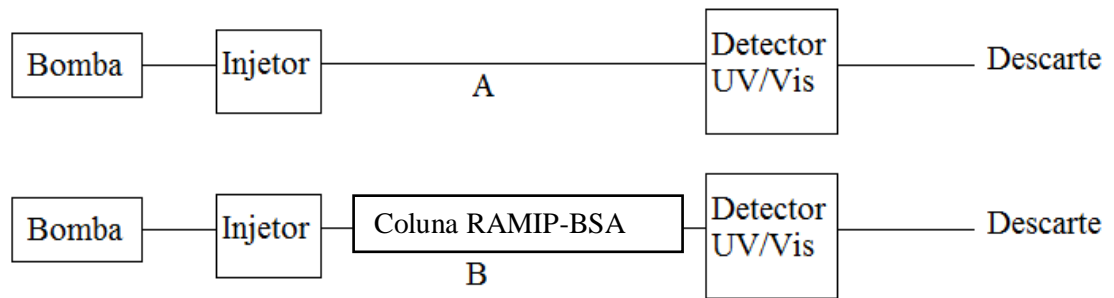
Os polímeros foram inicialmente caracterizados através da espectroscopia de absorção do infravermelho com transformada de Fourier com a finalidade de verificar os grupos funcionais presentes nos polímeros. As amostras de RAMIP, RAMIP-BSA e RANIP-BSA foram analisadas na faixa espectral de 500 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . A identificação dos grupos é alcançada devido à presença de ligações covalentes que absorvem várias frequências de radiação eletromagnética na região do infravermelho no espectro eletromagnético.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada após metalização com platina. As análises foram executadas em voltagem de 15 keV nas amostras de RAMIP, RAMIP-BSA e RANIP-BSA.

#### 4.5 ESTUDO DE ELIMINAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS

O estudo foi conduzido injetando-se inicialmente 25  $\mu\text{L}$  de um padrão aquoso de BSA de 44  $\text{mg mL}^{-1}$  (mesma concentração de albumina encontrada no plasma humano) em um sistema de HPLC sem a presença de qualquer coluna, usando água como fase móvel a uma vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$  (Figura 6A). Desta forma toda a BSA injetada foi direcionada ao detector que operava a 313 nm (comprimento de onda de absorção máxima da BSA). Sendo assim, pode-se considerar que o pico obtido corresponde a 100% de BSA. Em seguida, uma coluna RAMIP-BSA foi montada e colocada no percurso analítico (Figura 6B), e 25  $\mu\text{L}$  da mesma solução padrão aquosa de BSA de 44  $\text{mg mL}^{-1}$  foram injetados. O pico obtido foi empregado para avaliar o percentual de BSA eluído do RAMIP-BSA por meio de comparação com o pico correspondente a 100% de eluição obtido sem a presença da coluna.

**Figura 6** - Esquema utilizado para teste de eliminação de BSA nos polímeros sintetizados. O detector foi ajustado para 313 nm.



**Fonte:** Adaptado do autor, 2014.

#### 4.6 ESTUDOS DE ADSORÇÃO

Para a construção das isotermas de adsorção foram empregadas soluções padrão de FLUO nas concentrações de 200, 400, 600, 800, 1000, 1300 e 1500 mg L<sup>-1</sup>, preparadas em tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,0. O teste foi realizado a partir do método de batelada adicionando-se 0,5 mL das soluções padrão em tubos de ensaio contendo 10 mg de polímero. Os tubos foram agitados durante 60 minutos e centrifugados por 10 min a 1560 g. O sobrenadante de cada tubo foi coletado, filtrado e a concentração de FLUO foi determinada por HPLC. A capacidade adsortiva do polímero (Q<sub>e</sub>) em mg/g em cada concentração avaliada foi determinada por meio da concentração inicial (C<sub>i</sub>) de FLUO adicionada em cada tubo e da concentração de equilíbrio (C<sub>e</sub>) (ambas em mg/L) de acordo com a equação abaixo.

$$Q_e = 0,05 \times (C_i - C_e)$$

#### 4.7 ESTUDOS DE SELETIVIDADE

Os experimentos de seletividade foram realizados empregando-se padrões de VEN, CIT, PAR, FLUV, DUL, FLUO e SER na concentração de 600 mg L<sup>-1</sup>. Foi adicionado 0,5 mL de uma solução padrão mista contendo a fluoxetina e um outro

ISRS (VEN, CIT, FLUV, DUL ou SER) em tubos de ensaio contendo 10 mg de RAMIP-BSA. Os tubos foram agitados durante 60 minutos e centrifugados por 10 min a 1560 g. O sobrenadante de cada tubo foi coletado, filtrado e as concentrações de fluoxetina e do outro ISRS foram determinadas por HPLC em cada caso. As capacidades adsorptivas ( $Q_e$ , em mg/g) do polímero para cada molécula foram então determinadas. Para determinar a constante de seletividade, primeiramente é necessário obter a constante de ligação  $K$ . As constantes de ligação  $K$  do RAMIP-BSA para cada par FLUO / outro ISRS foram determinadas por meio da equação<sup>64</sup>:

$$K = \frac{Q_{e_{FLUO}}}{Q_{e_{outro\ ISRS}}}$$

O mesmo experimento descrito acima foi repetido empregando-se o RANIP-BSA, e as constantes  $K_{MIP}$  e  $K_{NIP}$  para cada par FLUO/outro ISRS foram empregadas para o cálculo da constante de seletividade por meio da equação abaixo<sup>64</sup>:

$$\alpha = \frac{K_{MIP}}{K_{NIP}}$$

#### 4.8 MONTAGEM E OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA MULTIDIMENSIONAL

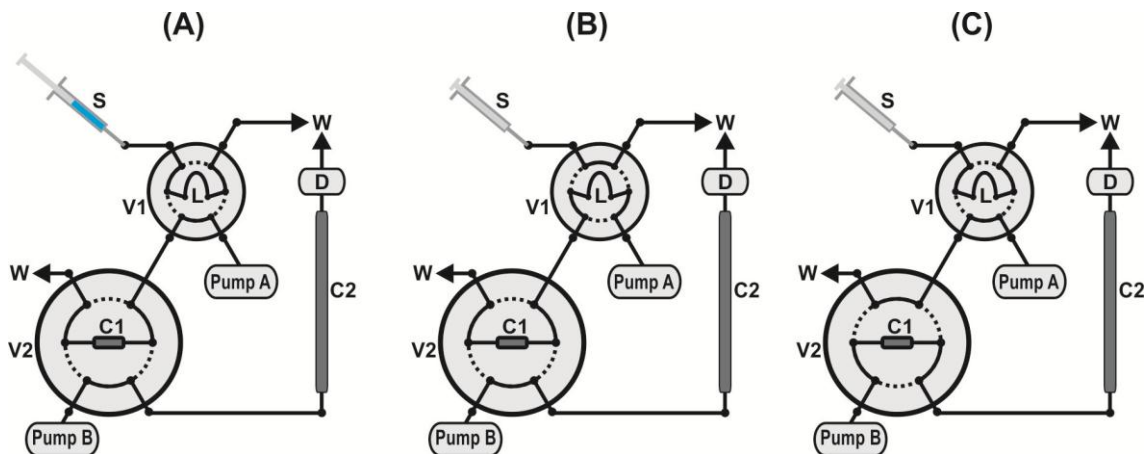
O sistema multidimensional foi utilizado por permitir que o preparo da amostra seja realizado diretamente no sistema cromatográfico. Desta forma o preparo das amostras de plasma foi feito pela coluna RAMIP-BSA inserida no sistema cromatográfico, logo após a injeção das amostras.

As condições de análise cromatográfica foram definidas com base na literatura e mediante algumas adaptações<sup>53</sup>. As condições foram: fase móvel de separação composta por tampão acetato de sódio 0,2 mol L<sup>-1</sup> pH 4,5, acetonitrila e metanol nas proporções de 60:37:3, v/v/v com vazão 1 mL min<sup>-1</sup>; coluna analítica Phenomenex Luna 5 µm, C18, 250 x 4,6 mm; água milli-Q como fase móvel de extração a uma vazão 1 mL min<sup>-1</sup>, tempo de eluição de 25 s e tempo de extração de 140 s.

O sistema foi montado no formato *backflush* (Figura 7), empregando duas bombas (A e B) que dispensam água e fase móvel tampão acetato de sódio 0,2 mol

$L^{-1}$  pH 4,5, acetonitrila e metanol nas proporções de 60:37:3, v/v/v. A bomba A é conectada a uma válvula de injeção manual (V1) com uma alça L de 200  $\mu$ L. V1 é também conectada a outra válvula (V2) (acionada eletronicamente) contendo a coluna RAMIP-BSA. A bomba B impulsiona a fase móvel de separação pela válvula V1 e sequencialmente pela coluna analítica e detector (230 nm). Cada análise foi dividida em 3 estágios, como mostrado na Figura 7. Primeiramente, a amostra é coletada em V1 por meio de uma seringa, até o completo preenchimento da alça de amostragem (L) (Figura 7A). V1 é então acionada manualmente (Figura 7B), e o volume contido na alça de amostragem flui através da coluna RAMIP-BSA a uma vazão de 0,5  $\text{mL min}^{-1}$ , durante 140 s. Ao mesmo tempo, um sinal elétrico é enviado ao computador, iniciando a aquisição dos sinais. Após 140 s, a válvula V2 é eletronicamente acionada (Figura 7C), e a fase móvel eluiu as moléculas retidas na coluna RAMIP-BSA a uma vazão de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$  durante 25 s. A válvula V2 é então desativada e o sistema assume novamente a configuração da Figura 7A. Enquanto isso, a corrida cromatográfica prossegue durante 20 min, e os analitos são separados e detectados na coluna analítica e no detector, respectivamente.

**Figura 7** - Sistema multidimensional nas posições de amostragem (A), extração (B) e eluição (C).



**Fonte:** Adaptado do autor, 2014.

#### 4.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

O método foi validado de acordo com normas do FDA<sup>51</sup>. As curvas analíticas foram preparadas para VEN, CIT, FLUV, DUL, FLUO e SER utilizando um padrão

misto dos respectivos fármacos nas concentrações de 20, 40, 80, 150, 300, 400, e 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , em um pool de plasmas humanos brancos (n=6). A PAR foi empregada como padrão interno (PI) na concentração de 300  $\mu\text{g L}^{-1}$ . As curvas foram traçadas através da razão das áreas dos picos do analito pelo padrão interno, *versus* cada concentração. As equações de regressão linear e os coeficientes de correlação (r) foram calculados pelo método dos mínimos quadrados.

A precisão foi determinada por meio da análise da repetitividade, expressa através da concordância dos resultados de análises realizadas em um único dia (n=6) e da precisão intermediária ou reprodutibilidade que analisa os resultados obtidos em dias diferentes (n=6:3). A precisão e exatidão intra-dias e inter dias foram avaliadas nas concentrações 20, 150 e 300  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Os resultados de precisão e exatidão foram expressos como desvio padrão relativo (DPR) e erro relativo (E), respectivamente, de acordo com as equações abaixo, onde sd é o desvio padrão das leituras,  $\bar{x}$  é a média, CA é a concentração analisada e CN é a concentração nominal.

$$\text{DPR} = \frac{\text{sd}}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{e} \quad \text{E} = \frac{\text{CA} - \text{CN}}{\text{CN}} \times 100.$$

O limite de quantificação foi determinado como a menor concentração que pôde ser analisada com precisão e exatidão. O limite de detecção foi determinado como a menor concentração que pode ser detectada pelo método, correspondendo a 3 vezes a relação sinal/ruído.

A avaliação da recuperação aparente foi realizada comparando-se a quantidade de analito extraído de uma amostra de plasma e a quantidade de analito extraído de uma amostra de água. Desta forma, foram fortificadas amostras de plasma e amostras de água com padrões na concentração de 20, 150 e 300  $\mu\text{g L}^{-1}$  (n=3). Ambas foram analisadas e pelo sistema multidimensional. A recuperação aparente pode ser obtida pela razão entre a resposta da extração dos analitos fortificados em plasma e a resposta da extração da mesma concentração do analito fortificada em água. As áreas obtidas das amostras de plasma humano foram comparadas com as áreas de padrões aquosos nas mesmas concentrações.

#### 4.10 AMOSTRAS

As amostras de plasmas sanguíneos utilizadas nas análises foram coletadas de doadores voluntários sadios que relataram não fazer uso dos respectivos fármacos e de doadores voluntários que relataram fazer uso dos respectivos fármacos. Os voluntários responderam e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A), depois de devidamente informados sobre os procedimentos e objetivos da pesquisa. As amostras foram coletadas em tubos vacutainer heparinizados (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA) e logo em seguida foram centrifugadas para a separação. As amostras coletadas dos doadores voluntários sadios foram fortificadas com os respectivos fármacos para etapa de otimização dos estudos e validação analítica e as amostras dos doadores voluntários que faziam administração dos respectivos fármacos foram fortificadas somente com padrão interno á PAR e avaliadas quanto á concentração terapêutica encontrada no plasma do paciente. Todas as amostras foram diluídas na proporção 1:1 com água purificada milli-Q, e filtradas em filtros aquosos 0,45 µm da *Millipore* antes da injeção. É importante ressaltar que não houve tratamento prévio das amostras antes da injeção nas colunas e no sistema cromatografico, uma vez que a etapa de preparo de amostras foi realizada de forma *on-line*.

Foram coletados 5 mL de sangue de cada voluntário sadio. A faixa etária compreendida entre os voluntários foi de 20 á 50 anos. Para maior controle das características das amostras, foi aplicado um questionário aos doadores, no qual os mesmos forneceram informações a respeito de seus dados pessoais, do uso de medicamentos e da presença de patologias e vícios. Os doadores foram informados e entrevistados pelo pesquisador. Todos consentiram com a pesquisa, responderam ao questionário de coleta de dados e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

A coleta foi realizada por uma farmacêutica qualificada para coletas de fluidos. Vale ressaltar que o laboratório onde foi realizadas as coletas confere condições de higiene e de toda a estrutura e equipamentos necessários para tal conduta.

Esta pesquisa foi realizada com base nas diretrizes e normas regulamentadoras envolvendo seres humanos do conselho nacional de saúde<sup>54</sup>. O

estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Alfenas (nº CAAE 10577712.4.0000.5142 – Aprovado) (Anexo B).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

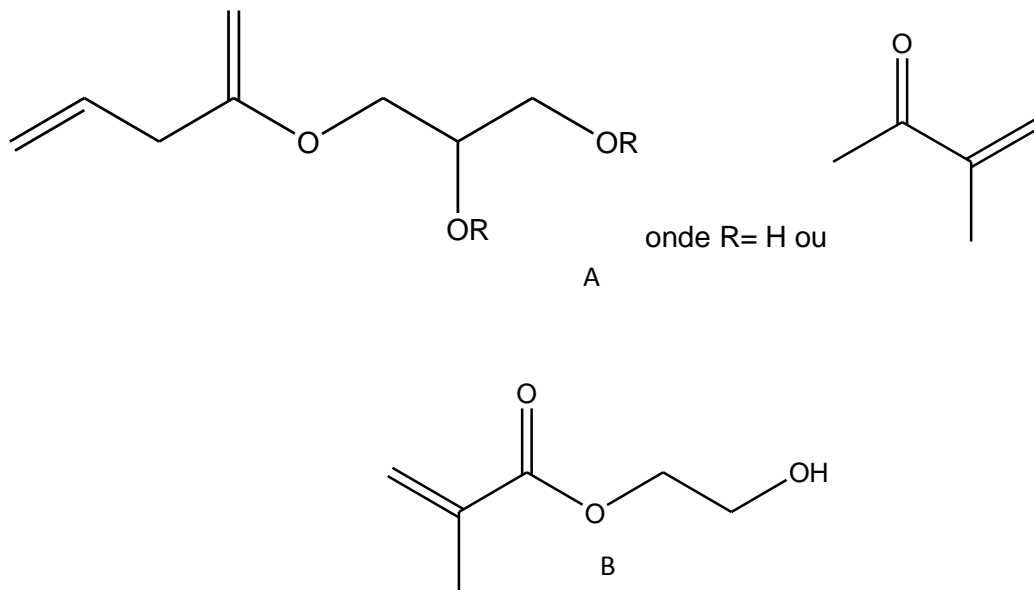
Os resultados obtidos serão discutidos a seguir.

### 5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS

O RAMIP-BSA foi sintetizado de acordo com um trabalho de Moraes et al (2013)<sup>50</sup>. Foram empregadas proporções molares de 1:4:10 de molécula modelo, monômero funcional e agente de ligação cruzada, respectivamente. A síntese foi executada pelo método de precipitação empregando um grande volume de solvente, com o objetivo de se obter um material mais homogêneo e polidisperso.

Foi investigado o efeito da adição de monômeros hidrofílicos no processo de síntese dos polímeros, com base em trabalhos encontrados na literatura que relatam que tais monômeros conferem hidrofilicidade à superfície do polímero, minimizando a ligação de macromoléculas. No presente trabalho, os monômeros GDMA e HEMA foram empregados. Também é importante salientar que, o momento da reação polimérica em que são adicionados tais monômeros é extremamente importante, no sentido de promover uma maior densidade de hidroxilas somente na camada mais superficial do polímero. Assim, esses monômeros hidrofílicos não causam interferência na formação dos sítios seletivos visto que a grande maioria destes já havia sido formada na primeira etapa de síntese (60 min). As estruturas químicas do GDMA e/ou HEMA são apresentadas na Figura 8. Ambos os reagentes são dotados de grupamento vinil capaz de integrar à rede polimérica, bem como de terminações hidrofílicas representadas pelos grupamentos hidroxila.

**Figura 8** - Estrutura química GDMA mistura de isômeros(A) e HEMA(B).



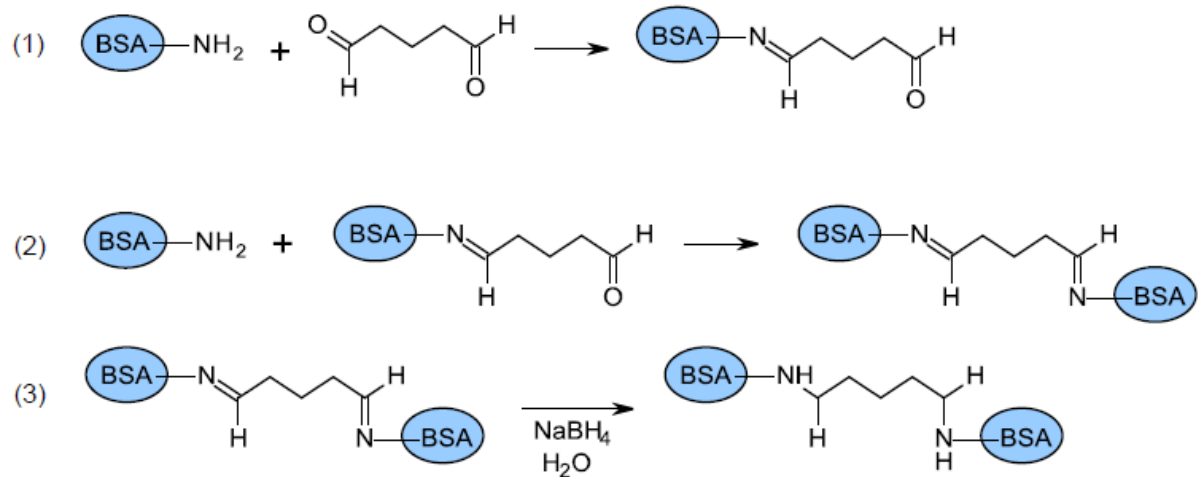
**Fonte:** Moraes et al., 2013<sup>50</sup>.

De acordo com Moraes *et al.*, 2013<sup>50</sup>, somente o emprego de monômeros hidrofílicos é insuficiente para tornar o polímero capaz de eliminar completamente as macromoléculas. Assim, os autores recomendam a cobertura do polímero com uma camada de BSA, tornando-o biocompatível com os fluidos protéicos e aumentando assim a capacidade de exclusão. Esse fato ocorre devido à repulsão eletrostática entre as proteínas da amostra e da capa protéica quando a extração ocorre em pH diferente do ponto isoelétrico das proteínas. Ao mesmo tempo, os analitos de baixo peso molecular se difundem pelas cadeias de proteína e se ligam aos sítios seletivos do RAMIP-BSA.

Durante o processo de revestimento, a reação entre o glutaraldeído e a albumina resultou na formação de iminas, que são compostos pouco estáveis. Desta forma, o glutaraldeído foi percolado á uma vazão de 5 mL min<sup>-1</sup>. Finalmente, 10 mL de borohidreto de sódio 1% (m/v) foram passados pelo cartucho a 1 mL min<sup>-1</sup> com o objetivo de reduzir as iminas em aminas que são compostos mais estáveis.

A Figura 9 representa as reações químicas que estão envolvidas na formação capa protetoras do revestimento com BSA.

**Figura 9** - reações químicas envolvidas na cobertura do RAMIP com BSA.

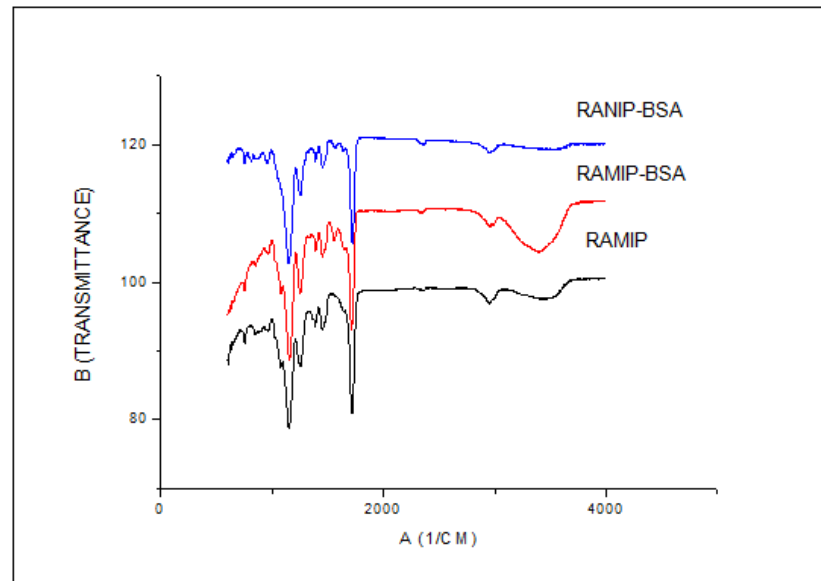


Fonte: Adaptado do autor, 2014.

A etapa 1 está representado a reação que ocorre entre o grupamento amina da BSA e o aldeído do glutaraldeído. A etapa 2 está representado a reação entre o aldeído livre do complexo BSA-glutaraldeído e o grupo amina de outra molécula de albumina, permitindo assim a formação da rede de BSA em volta do RAMIP. Por fim, a etapa 3 está representado a conversão das iminas em aminas com a adição do borohidreto.

Os espectros de infravermelho dos polímeros estão representados na Figura 10. Pode-se observar que os espectros são muito semelhantes, demonstrando que não houve diferença significativa nos polímeros antes e após o revestimento com BSA. A dificuldade na diferenciação dos polímeros foi devido à grande variedade de ligações que se encontram na mesma região. Um exemplo é a ligação O-H que está presente em vários reagentes da síntese.

**Figura 10** - Espectros de infravermelho do RANIP-BSA, RAMIP-BSA e RAMIP.

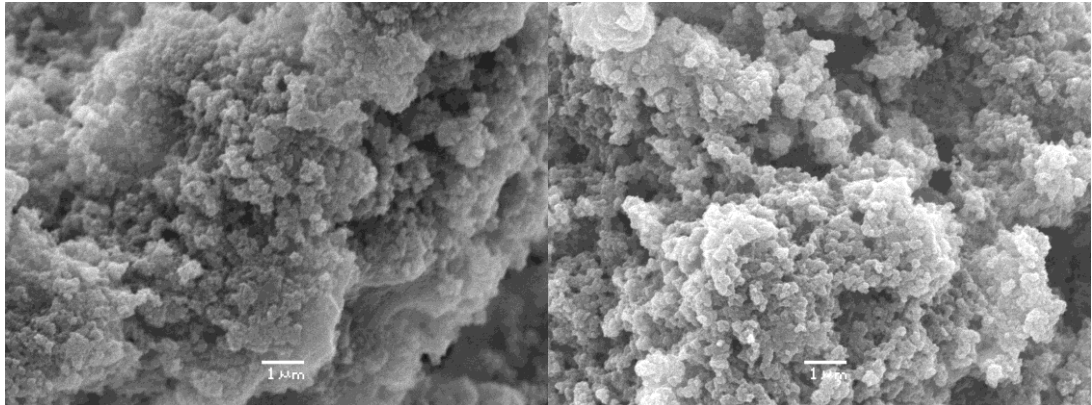


Fonte: Do autor, 2014.

Os picos que correspondem às vibrações de estiramento das ligações C-O (1156 1/cm) e C=O (1721 1/cm) foram iguais no RANIP-BSA e RAMIP-BSA. Este fato pode ser explicado devido à presença dos grupos hidroxila e carbonila presentes no HEMA e no GDMA.

No entanto, os picos correspondentes às vibrações de estiramento das ligações C-N (na banda abaixo de 1550 1/cm), C=N (1500 á 1350 1/cm) e novamente um C-N (3000 1/cm) estão mais intensos no RAMIP-BSA. Isto se deve provavelmente as aminas presentes na molécula de BSA. No processo de revestimento do RAMIP com BSA há formação de uma rede de BSA no material que correspondem às bandas de vibrações de estiramento das ligações C-N na Figura 10. Os polímeros foram também caracterizados por MEV, como mostrado na Figura 10 abaixo. A imagem A representa o RAMIP e a imagem B representa o RAMIP-BSA (obtido após o revestimento com BSA), no qual é possível perceber um aumento no tamanho das partículas, provavelmente devido à formação de uma cápsula protéica (BSA) ao redor das partículas do polímero.

**Figura 11** - Micrografia eletrônica de varredura do RAMIP (A) e do RAMIP-BSA (B).  
**(A)** **(B)**

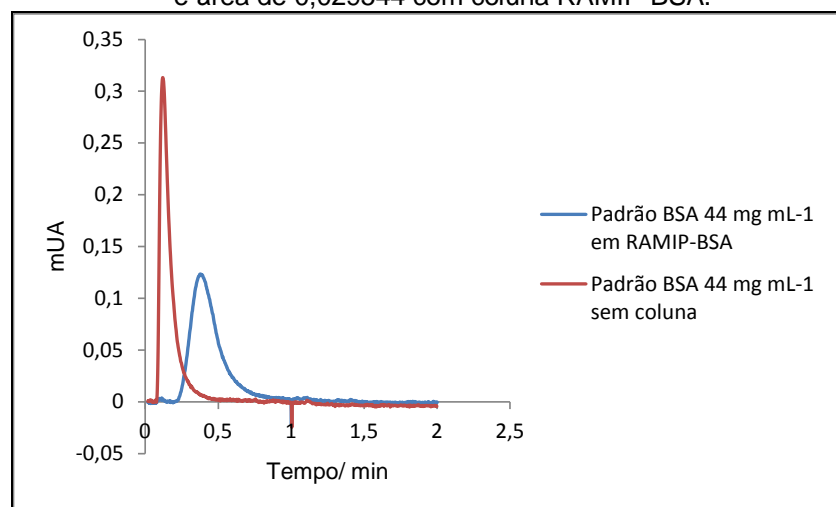


Fonte: Do autor, 2014.

## 5.2 ESTUDOS DE ELIMINAÇÕES DE PROTEÍNAS

As Figuras 12 e 13 apresentam os resultados obtidos após a injeção do padrão de BSA em um sistema sem coluna e no sistema com as colunas RAMIP-BSA e RANIP-BSA. Como pode ser visto, a eliminação de proteínas foi de 99,5 e 99,2% para o RAMIP-BSA e RANIP-BSA, respectivamente. Esses valores são extremamente satisfatórios e atestam que esses materiais podem ser utilizados na extração direta de fármacos em fluidos biológicos, porque são realmente capazes de excluir proteínas.

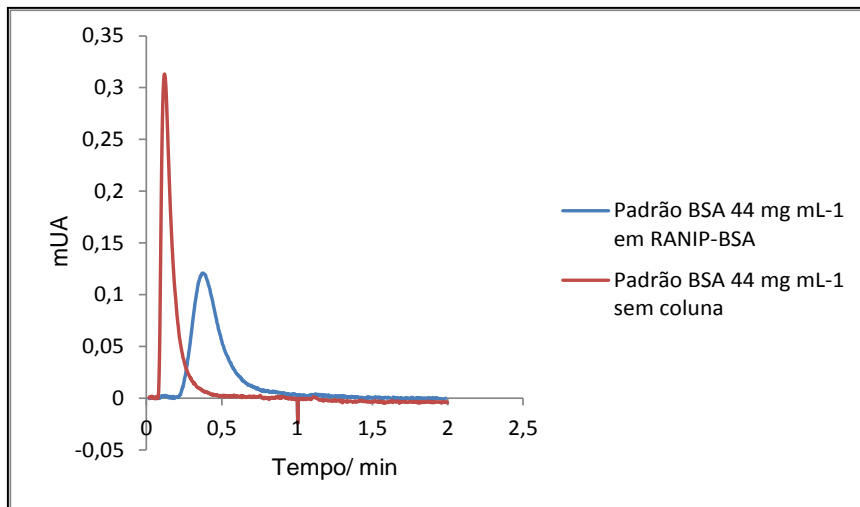
**Figura 12** - Cromatograma obtido com respectiva área de 0,029684 para padrão de BSA 44 mg mL<sup>-1</sup> em sistema sem coluna e área de 0,029544 com coluna RAMIP-BSA.



**Nota:** As análises foram feitas em HPLC com detector UV.

**Fonte:** Do autor, 2014.

**Figura 13** - Cromatograma obtido com respectiva área de 0,029684 para padrão de BSA 44 mg mL<sup>-1</sup> em sistema sem coluna e área de 0,029448 em sistema com coluna RAMIP-BSA.



**Nota:** As análises foram feitas em HPLC com detector UV.

**Fonte:** Do autor, 2014.

### 5.3 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

A adsorção é um processo de acumulação, transferência e concentração seletiva de um ou mais constituintes contidos numa fase fluida sobre superfícies sólidas. O adsorvente é o material sobre o qual ocorre a adsorção, e o adsorbato é a substância adsorvida. A formação de uma camada adsorvida numa superfície é governada pela velocidade de difusão da substância através da solução, em direção à interface e por isso não é um processo instantâneo<sup>55, 56, 57</sup>. Vários fatores podem influenciar a intensidade e o efeito da adsorção, tais como a estrutura molecular, tamanho da partícula do material adsorvente, a solubilidade do soluto, o pH do meio, o tempo de contato, a temperatura entre outros<sup>56, 57</sup>.

A adsorção pode ser avaliada quantitativamente através das isotermas. Para este procedimento experimental basta colocar em contato a solução contendo o componente a ser adsorvido com diferentes massas de adsorvente até atingir o equilíbrio. Após a filtração pode-se obter a concentração de equilíbrio em solução ( $C_e$  em mg L<sup>-1</sup>) e a quantidade de material adsorvido ( $Q_e$  em mg g<sup>-1</sup>). As isotermas de adsorção obtidas são curvas extremamente úteis, que fornecem informações sobre o mecanismo de como o adsorvente efetivamente adsorverá o soluto, além de

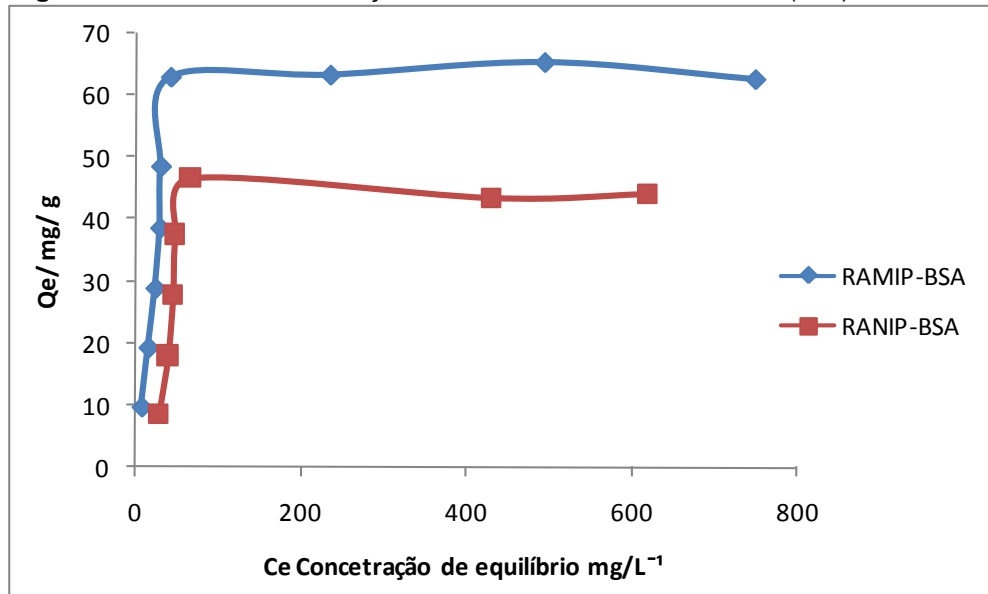
dar a relação de equilíbrio entre a concentração na fase fluida e a concentração nas partículas adsorventes, na qual proporcionam uma estimativa da quantidade máxima de soluto que o adsorvente adsorverá<sup>58, 59</sup>. A teoria da isoterma de Langmuir assume o modelo mais simples das isotermas de adsorção. A teoria de Langmuir demonstra que as forças que atuam na adsorção são similares em natureza às aquelas que envolvem combinação química. Isso se considera implicitamente que: a) o sistema é ideal; b) que as moléculas são adsorvidas e aderem à superfície do adsorvente em sítios definidos, com adsorção em monocamada em superfície homogênea; c) que cada sítio pode acomodar somente uma entidade adsorvida e que a energia da entidade adsorvida é a mesma em todos os sítios da superfície<sup>57</sup>.

A teoria da isoterma de Freundlich corresponde a uma distribuição exponencial de calores de adsorção. Representa uma adsorção não ideal em superfícies heterogêneas, bem como uma adsorção em multicamada. A equação de Freundlich sugere que a energia de adsorção decresce logaritmicamente, à medida que a superfície vai se tornando coberta pelo analito<sup>47, 67, 60, 61</sup>.

Primeiramente, foram levados em consideração dois parâmetros importantes para a realização das isotermas: o pH de adsorção e o tempo de agitação. O pH de adsorção estabelecido foi  $7,4 \pm 0,5$  (mesmo pH do plasma sanguíneo). Com relação ao tempo de agitação, foi estabelecido um tempo de 60 min, com base nos estudos de Moraes et al, 2013<sup>46</sup>, onde foi constatado que o equilíbrio de adsorção é estabelecido em tempos superiores a 50 min.

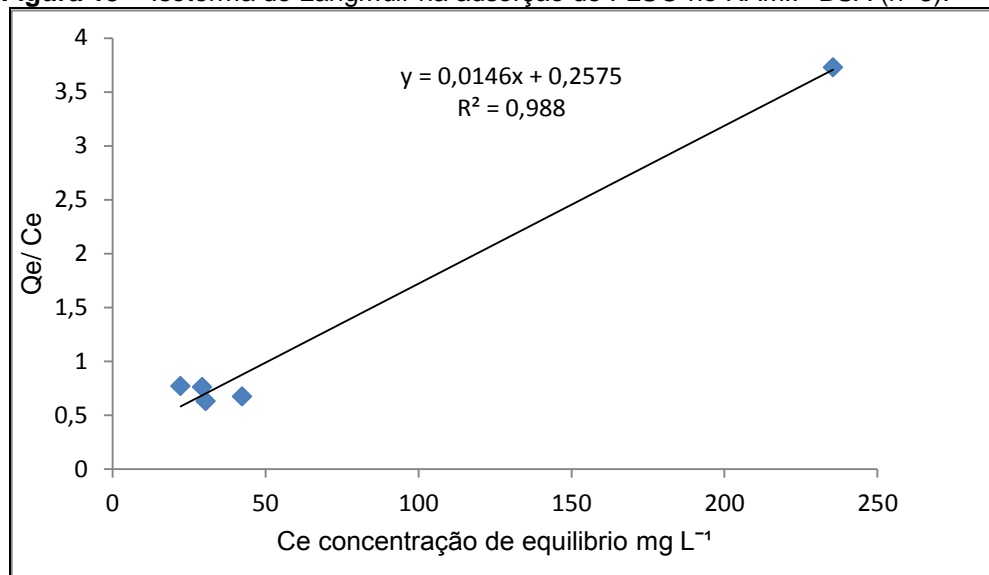
Na Figura 14 é mostrado o perfil de adsorção da FLUO no RAMIP-BSA e no RANIP-BSA à medida que a concentração foi aumentada.

**Figura 14** - Isoterma de adsorção do RAMIP-BSA frente à FLUO (n=3).

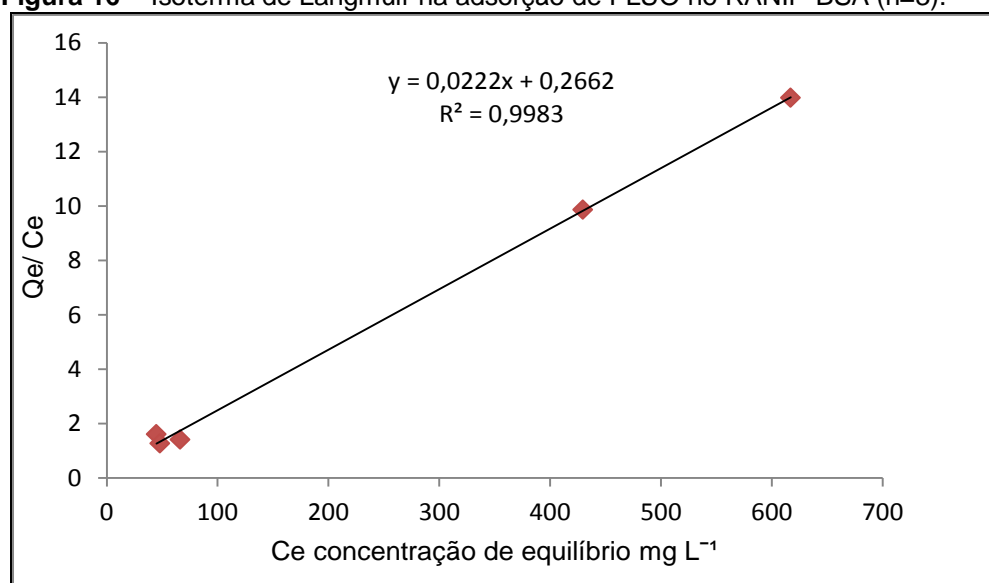


Fonte: Do autor, 2014.

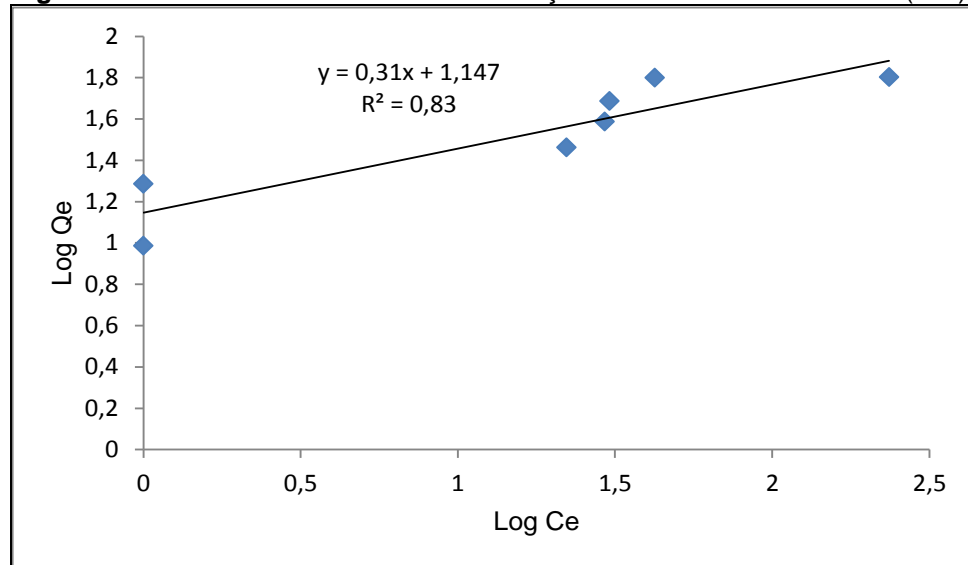
Os dados de adsorção foram então ajustados aos modelos de Langmuir e Freundlich, conforme as Figuras 15, 16, 17 e 18. Como pode ser visto, os melhores ajustes para RAMIP-BSA e RANIP-BSA foram obtidos para o modelo de Langmuir. A *isoterma de Langmuir* é dada por:  $C_e/Q_e = C_e/M + 1/(KM)$ , onde  $Q_e$  é a quantidade adsorvida de FLUO ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $C_e$  é a concentração de equilíbrio ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de FLUO,  $M$  é a capacidade máxima de adsorção de FLUO e  $K$  é constante de ligação. Este modelo foi originalmente desenvolvido para representar a adsorção química sobre os sítios ativos presentes na superfície do adsorvente. De acordo com esse modelo, os sítios de adsorção possuem a mesma energia independente da superfície coberta, ou seja, são energeticamente homogêneos. A adsorção máxima ocorre quando a superfície de adsorção é coberta com uma monocamada de adsorbato<sup>47, 67, 60, 61</sup>.

**Figura 15** - Isoterma de Langmuir na adsorção de FLUO no RAMIP-BSA (n=3).

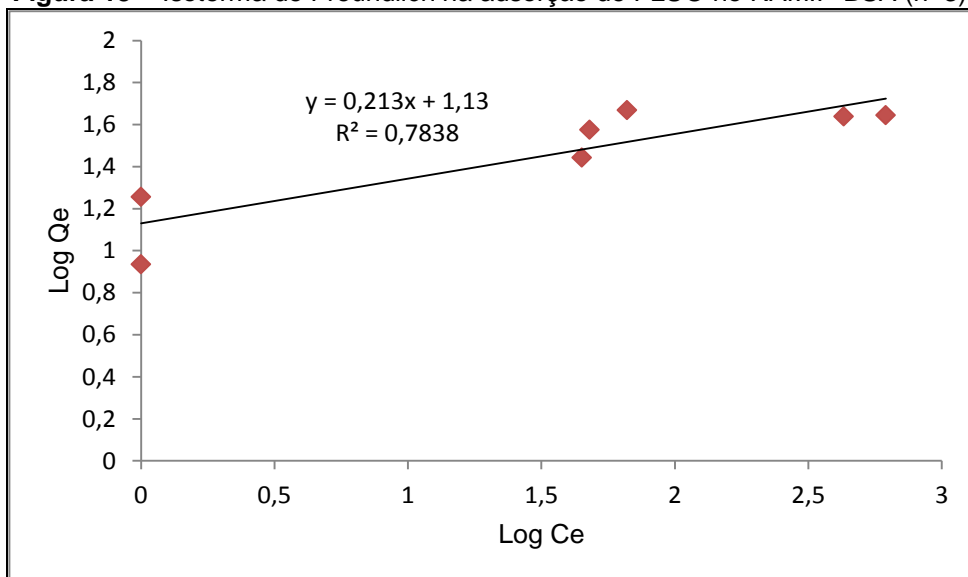
Fonte: Do autor, 2014.

**Figura 16** - Isoterma de Langmuir na adsorção de FLUO no RANIP-BSA (n=3).

Fonte: Do autor, 2014.

**Figura 17** - Isoterma de Freundlich na adsorção de FLUO no RAMIP-BSA (n=3).

Fonte: Do autor, 2014.

**Figura 18** - Isoterma de Freundlich na adsorção de FLUO no RAMIP-BSA (n=3).

Fonte: Do autor, 2014.

Sendo assim, pode-se constatar que a capacidade máxima adsorptiva obtida para RAMIP-BSA e RANIP-BSA frente à FLUO foram de 68,5 e 45,1 mg g<sup>-1</sup>.

Finalmente, um fator de separação (RL) de 0,23 foi obtido utilizando-se o coeficiente de correlação linear (LC) do modelo de Langmuir, de acordo com a seguinte equação:

$$RL = LC / (LC + 1)$$

Quando  $0 < RL < 1$ , como no presente caso, o fenômeno de adsorção é termodinamicamente favorável<sup>62, 63</sup>.

Como pode ser observado, existe uma grande diferença entre as capacidades adsorptivas do RAMIP-BSA e RANIP-BSA (cerca de  $23,4 \text{ mg g}^{-1}$ ). Essa diferença pode explicar a existência de sítios seletivos no material impresso.

Vale ainda ressaltar que a FLUO foi utilizada como MM, porém todos os testes que envolvem o desenvolvimento deste trabalho (seletividade, otimização de métodos cromatográficos e validação) não foram exclusivos da FLUO e sim para uma mistura de fármacos antidepressivos ISRS (VEN, CIT, PAR, FLUV, DUL, FLUO e SER).

#### 5.4 ESTUDOS DE SELETIVIDADE

A seletividade foi avaliada por meio do cálculo da constante de ligação da FLUO frente a outro ISRS. Verifica-se que, quanto maior o valor de K, maior será a retenção da fluoxetina em detrimento aos outros ISRS. No entanto, a seletividade do material não pode ser avaliada somente com base na constante K. Para tanto, deve-se empregar o coeficiente de seletividade ( $\alpha$ ) que mede a seletividade do polímero impresso frente ao polímero não impresso<sup>64</sup>.

Os resultados são apresentados na Tabela 1, e como pode ser visto o RAMIP-BSA apresentou valores de K maiores que 1 para todos os ISRS, comprovando a maior afinidade desse material pela MM (FLUO) em relação às demais moléculas. Além disso, para todos os ISRS, o fator  $\alpha$  foi maior que 1, indicando a provável presença dos sítios seletivos no polímero impresso<sup>64</sup>.

**Tabela 1** – Seletividade e seus respectivos resultados

<b>Fármacos (n=2)</b>	<b>Constante</b>	<b>RAMIP-BSA</b>	<b>RANIP-BSA</b>
<b>VEN</b>	<b>K</b>	2,63	1,47
	<b><math>\alpha</math></b>		1,78
<b>CIT</b>	<b>K</b>	2,52	1,41
	<b><math>\alpha</math></b>		1,77
<b>PAR</b>	<b>K</b>	2,35	1,36
	<b><math>\alpha</math></b>		1,72
<b>FLUV</b>	<b>K</b>	1,82	1,04
	<b><math>\alpha</math></b>		1,75
<b>DUL</b>	<b>K</b>	2,03	1,17
	<b><math>\alpha</math></b>		1,73
<b>SER</b>	<b>K</b>	2,89	1,47
	<b><math>\alpha</math></b>		1,96

**Fonte:** Do autor, 2014.

#### 5.4 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA MULTIDIMENSIONAL

Para a otimização do sistema multidimensional foram estudadas variáveis como composição, proporção, natureza e pH da fase móvel, comprimento de onda dos fármacos em estudo, configurações da coluna RAMIP-BSA, volume de injeção da amostra, comprimento de onda de maior absorção para cada fármaco em estudo, pH da fase de extração, tempo de extração e tempo de eluição. As otimizações foram feitas empregando-se amostras de plasma branco fortificadas com VEN, CIT, PAR, FLUV, DUL, FLUO e SER nas concentrações de 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

##### 5.5.1 Composição da fase móvel de separação

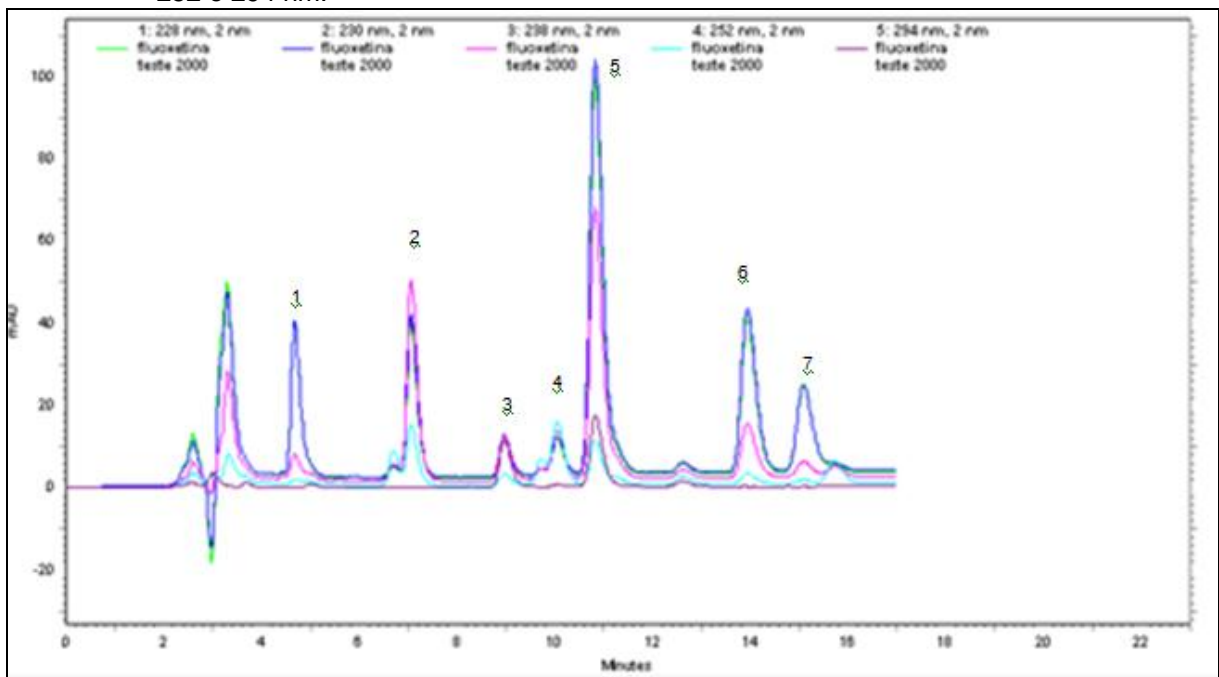
Inicialmente a composição da fase móvel dispensada pela bomba B (Figura 8) foi avaliada em função da proporção e natureza do solvente. Partiu-se então de uma fase móvel encontrada na literatura<sup>65</sup> composta por tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 4,5 e metanol na proporção de (60:40, v/v) que resultou em uma sobreposição dos picos, dificultando sua integração. Secundariamente, foi utilizada a mesma composição de fase móvel, mas com modificação na sua proporção modificada para 50:50,v/v, 55:45, v/v e por último 70:30, v/v. No entanto em todos os casos houve

sobreposição de picos resultando em uma inadequada resolução cromatográfica. Assim, com base na literatura<sup>53</sup>, uma fase móvel composta de tampão acetato de sódio 0,02 mol L<sup>-1</sup>, pH 4,5: acetonitrila: metanol na proporção de (60:37:3, v/v/v) foi avaliada, sendo obtidas boas resoluções cromatográficas para todos os analitos. Essa fase móvel apresentou também resultados satisfatórios em termos de pressão interna do sistema, sendo então selecionada como condição de trabalho.

### 5.5.2 Comprimento de onda

Seis diferentes comprimentos foram estudados: 229, 230, 238, 252 e 294 nm no sentido de aumentar a sensibilidade. Como apresentado na figura 19, os melhores resultados foram obtidos para o comprimento de onda de 230nm sendo este adotado como condição de trabalho.

**Figura 19** - Cromatograma da injeção de padrão misto de (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER representando os comprimentos de onda 229, 230, 238, 252 e 294 nm.

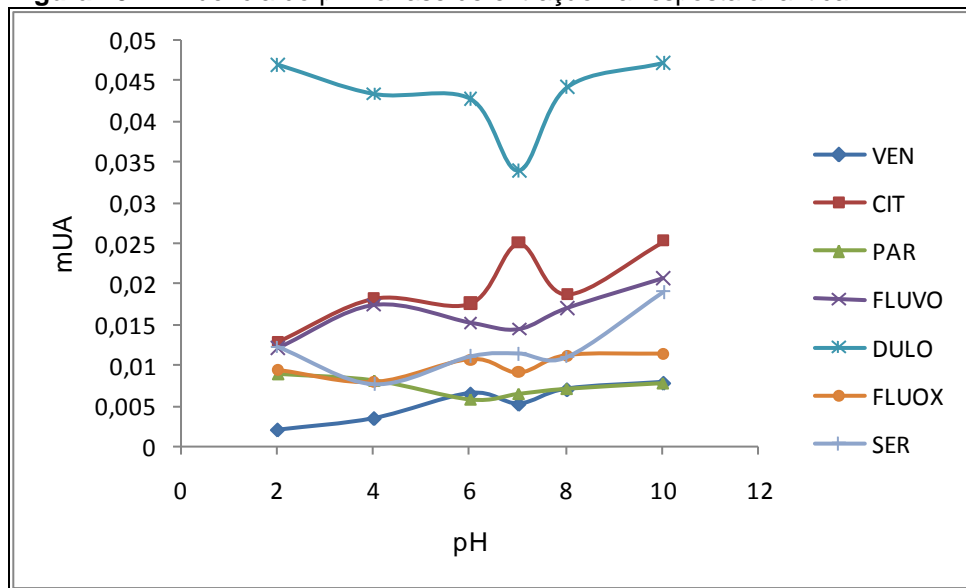


Fonte: Do autor, 2014.

### 5.5.3 pH da fase de extração

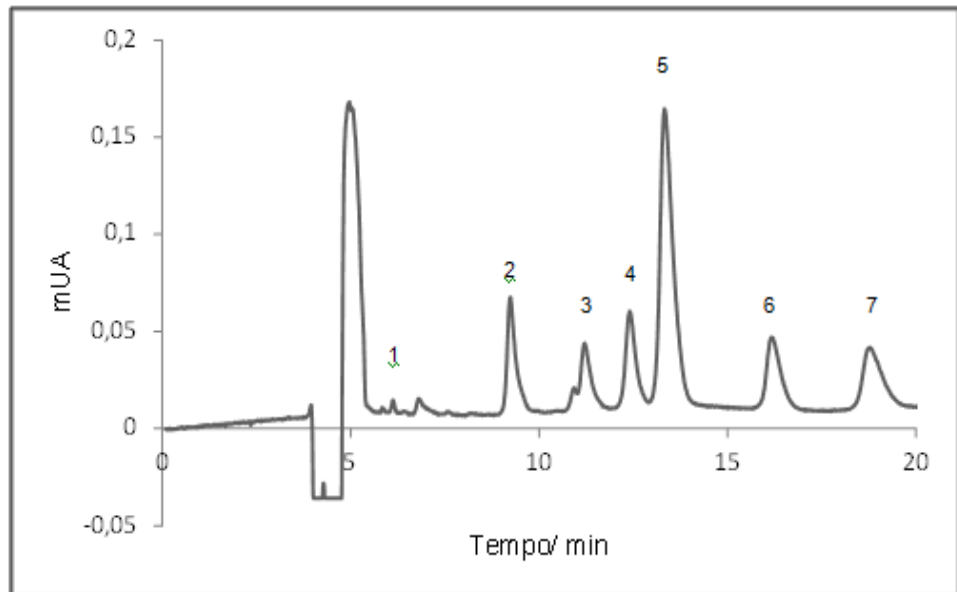
A fase de extração dispensada pela bomba B (Figura 8) foi água milli-Q e o seu pH foi investigado com o intuito de melhorar a eficiência de eliminação de interferentes. Foram testados os pHs de 2,0 a 10,0, ajustados com soluções aquosas de HCl 0,05 mol L<sup>-1</sup> ou NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Os resultados em termos de intensidade dos sinais analíticos, são apresentados na Figura 20. As Figuras 21 a 26 mostram cromatogramas obtidos para diferentes valores do pH de extração.

**Figura 20** - Influência do pH na fase de extração na resposta analítica.



Fonte: Do autor, 2014.

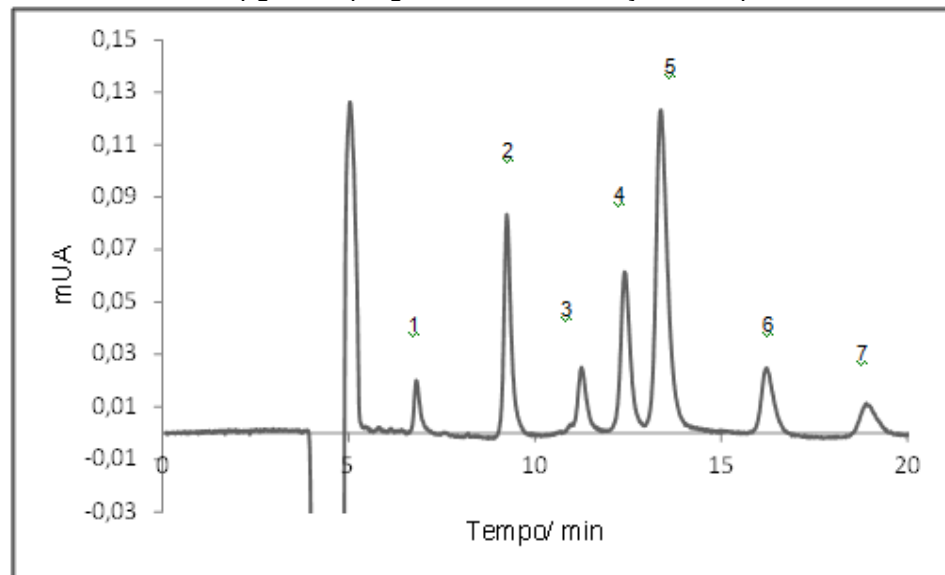
**Figura 21** - Cromatograma da injeção de padrão misto de (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER na concentração de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  empregando fase de extração com pH 2,0



**Nota:** Os tempos de retenção da (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER foram respectivamente de 6,73; 9,19; 11,13; 12,34; 13,28; 16,29 e 18,65 min.

**Fonte:** Do autor, 2014.

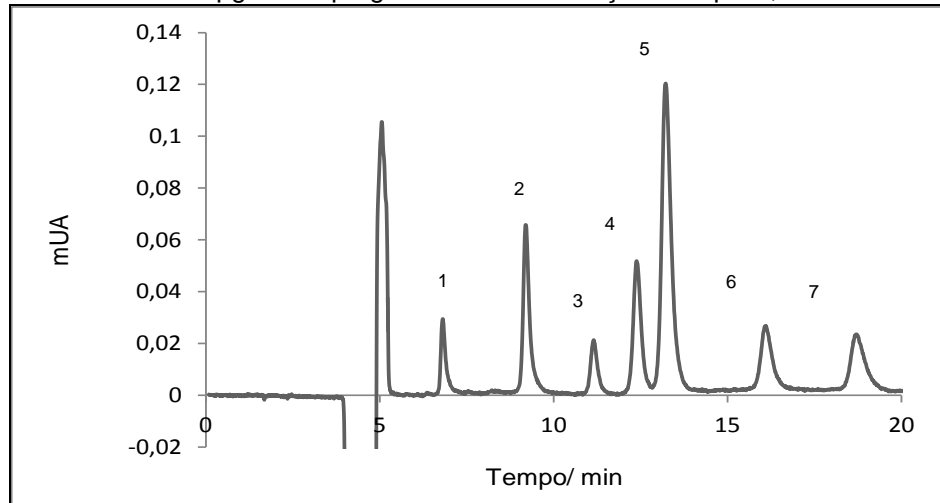
**Figura 22** - Cromatograma da injeção de padrão misto de (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER na concentração de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  empregando fase de extração com pH 4,0



**Nota:** Os tempos de retenção da (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER foram de 6,77; 9,16; 11,07; 12,34; 13,18; 16,01 e 18,70 min, respectivamente.

**Fonte:** Do autor, 2014.

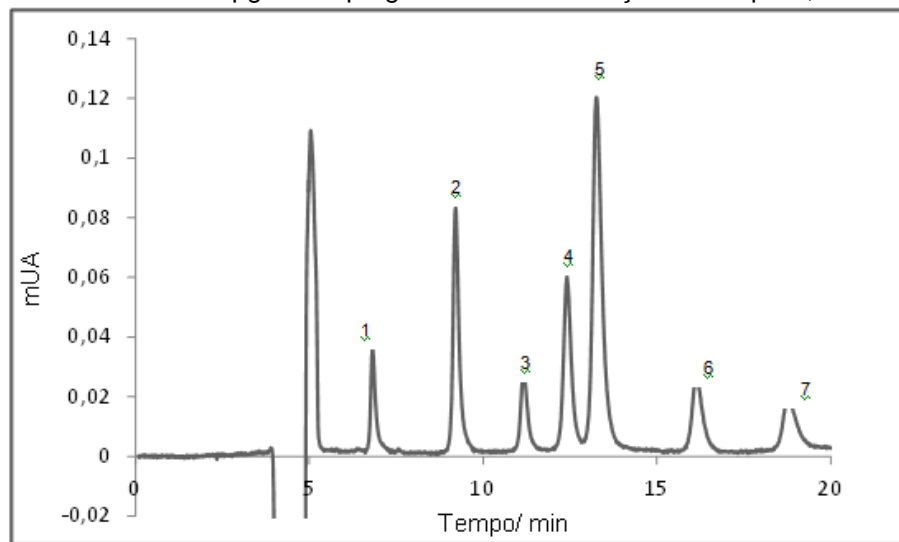
**Figura 23:** Cromatograma da injeção de padrão misto de (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER na concentração de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  empregando fase de extração com pH 6,0.



**Nota:** Os tempos de retenção da (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER foram de 6,78; 9,17; 11,12; 12,37; 13,22; 16,04 e 18,65 min, respectivamente

**Fonte:** Do autor, 2014.

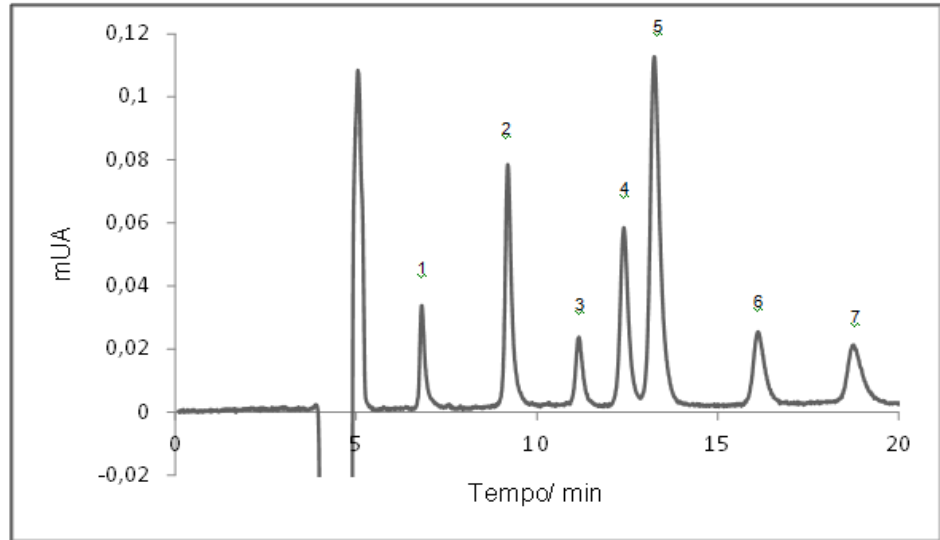
**Figura 24 -** Cromatograma da injeção de padrão misto de (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER na concentração de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  empregando fase de extração como pH 7,0.



**Nota:** Os tempos de retenção da (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER foram de 6,78; 9,17; 11,12; 12,37; 13,22; 16,04 e 18,65 min, respectivamente.

**Fonte:** Do autor, 2014.

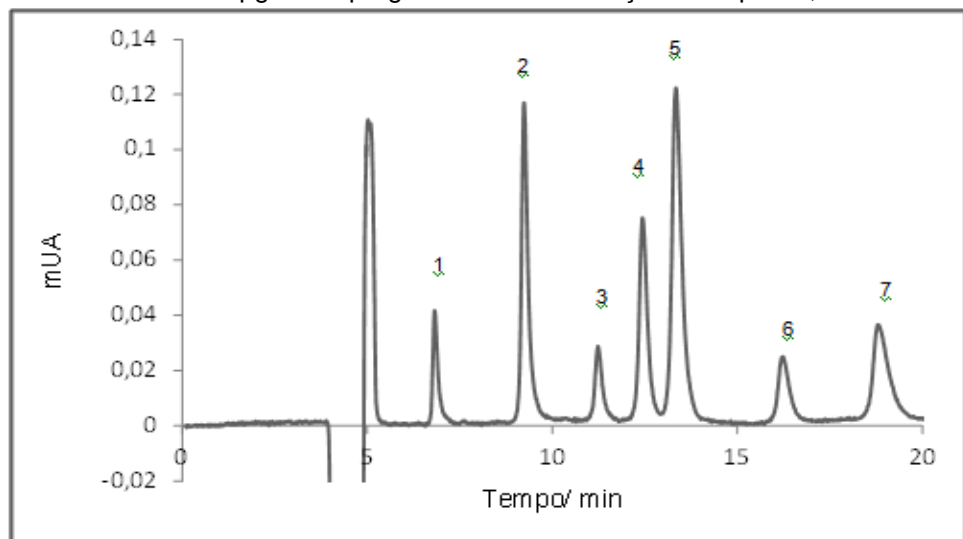
**Figura 25** - Cromatograma da injeção de padrão misto de (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER na concentração de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  empregando fase de extração com pH 8,0.



**Nota:** Os tempos de retenção da (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER foram de 6,77; 9,16; 11,09; 12,36; 13,20; 16,03 e 18,63 min, respectivamente.

**Fonte:** Do autor, 2014.

**Figura 26** - Cromatograma da injeção de padrão misto de (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER na concentração de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  empregando fase de extração com pH 10,0.



**Nota:** Os tempos de retenção da (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER foram de 6,78; 9,21; 11,18; 12,39; 13,30; 16,13 e 18,73 min, respectivamente.

**Fonte:** Do autor, 2014.

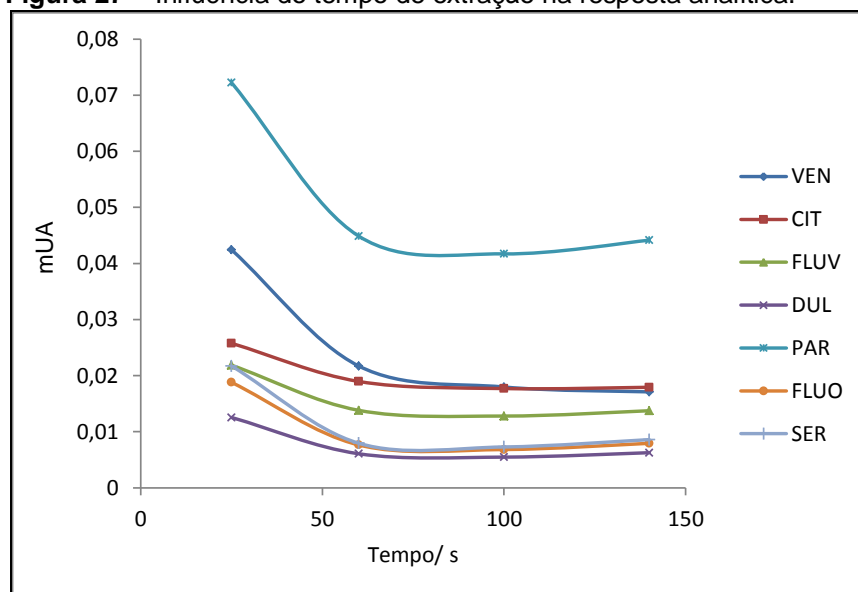
Os resultados demonstram que não houve variação significativa na sensibilidade nos diferentes valores de pH, a não ser para VEN e CIT que apresentaram diminuição e aumento do sinal analítico para o pH de 7,0,

respectivamente. Por outro lado, as resoluções cromatográficas foram menores para os pHs 2,0 e 4,0. Dessa forma, optou-se por empregar o pH entre 6,0 e 7,0 como condição de trabalho, uma vez que os cromatogramas obtido nessa condição foram satisfatório em termos de resolução cromatográfica, e a sensibilidades foram suficientes para a análise de todos os fármacos em estudo. Além disso, nessa faixa de pH, todas as proteínas (do sorvente e da amostra) encontram-se na forma ionizada, o que favorece a exclusão das proteínas da amostras por repulsão eletrostática, impedindo-as de se ligar no RAMIP-BSA. Assim, a alta eficiência na eliminação de proteínas é conseguida para a amostra de pH maior do que o ponto isoeléctrico de BSA (4,7-5,6).

#### 5.5.4 Tempo de extração

Os tempos de extração estudados foram: 25, 50, 80, 100 e 140 s. Os resultados, em termos de magnitude de sinal analítico, são apresentados na Figura 27.

**Figura 27** - Influência do tempo de extração na resposta analítica.



Fonte: Do autor, 2014.

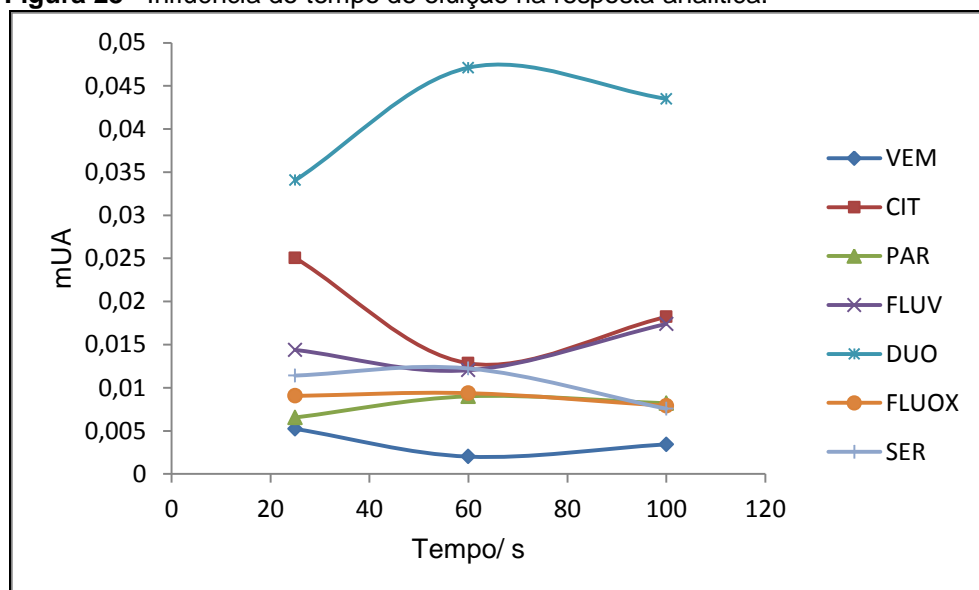
Uma diminuição significativa dos sinais analíticos foi observada quando o tempo de extração foi aumentado de 25 para 80 s. Esse resultado pode ser explicado pela eluição de moléculas retidas no polímero de forma não seletiva (fora

dos sítios de ligação). Contudo, para tempos maiores que 80 s, não houve variação significativa dos sinais analíticos, comprovando que os analitos remanescentes provavelmente estão ligados ao RAMIP-BSA nos sítios seletivos (de forma mais intensa). Dessa forma, no sentido de favorecer extrações mediadas por interações específicas, optou-se por empregar o tempo de extração de 140 s. Além disso, vale ressaltar que um maior tempo de extração também favorece a exclusão das proteínas da amostra pelo RAMIP-BSA.

### 5.5.5 Tempo de eluição

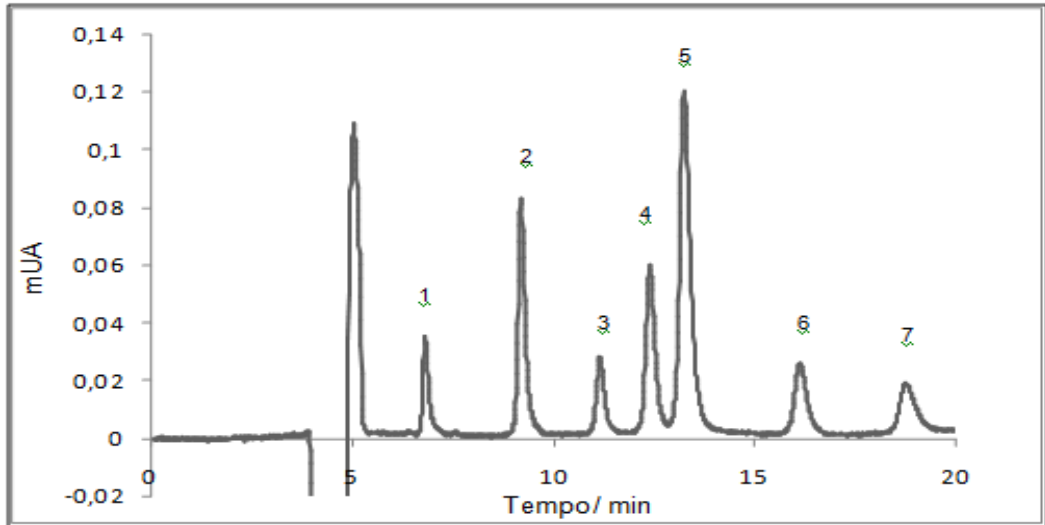
Tempos de 25, 60 e 100 s foram avaliados para a eluição dos analitos da coluna RAMIP-BSA, e os resultados, em termos de magnitude dos sinais analíticos, são apresentados na Figura 24. Como pode ser visto, não houve variação significativa na resposta analítica para a maioria dos analitos quando o tempo de eluição foi aumentado de 25 para 100 s. Além disso, como observado nos cromatogramas das Figuras 25 a 27, as melhores resoluções foram obtidas para o tempo de extração de 25 s, sendo este então selecionado como condição de trabalho. Vale também salientar que nenhum efeito de memória foi constatado para análises com tempo de eluição de 25 s, atestando que houve uma completa eluição dos analitos

**Figura 28** - Influência do tempo de eluição na resposta analítica.



Nota: Do autor, 2014.

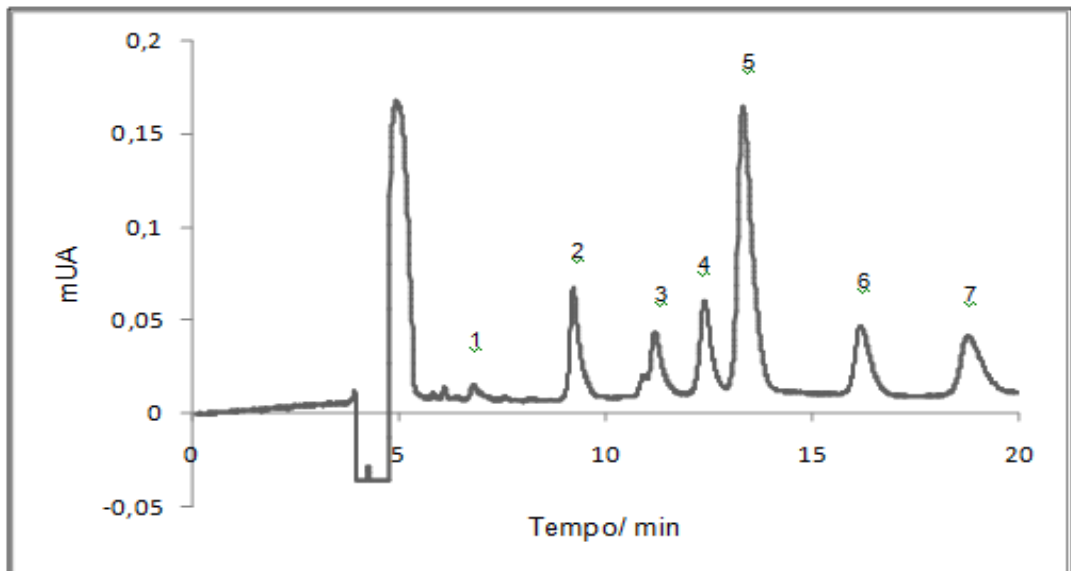
**Figura 29** - Cromatograma da injeção de padrão misto de (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER na concentração de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  empregando tempo de eluição de 25 s.



**Nota:** Os tempos de retenção da (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER foram de 6,78; 9,17; 11,12; 12,37; 13,22; 16,04 e 18,65 min, respectivamente.

**Fonte:** Do autor, 2014.

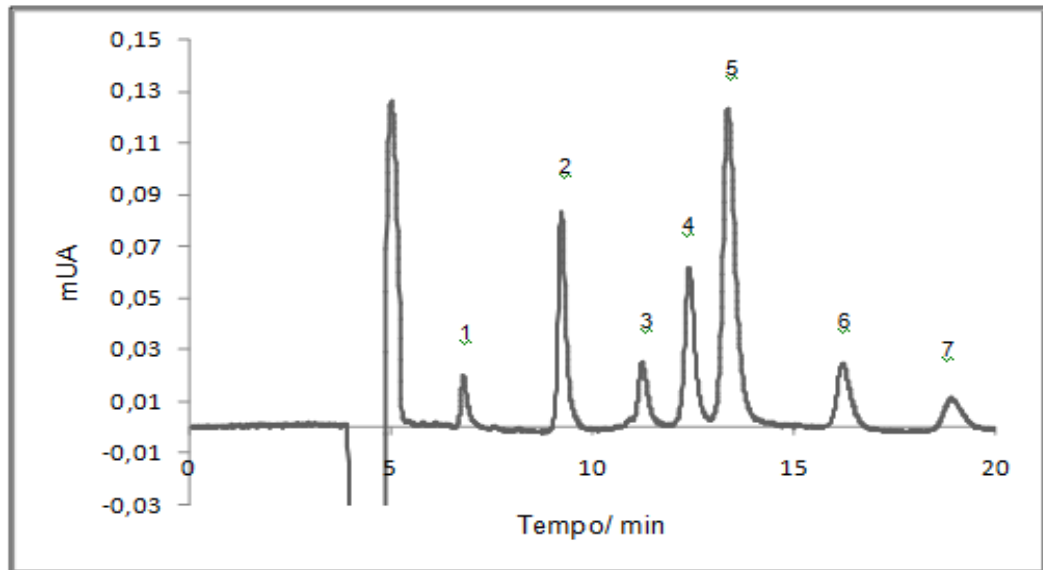
**Figura 30** - Cromatograma da injeção de padrão misto de (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER na concentração de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  empregando tempo de eluição de 60 s.



**Nota:** Os tempos de retenção da (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER foram de 6,73; 9,19; 11,13; 12,34; 13,28; 16,29 e 18,65 min, respectivamente.

**Fonte:** De autor, 2014.

**Figura 31** - Cromatograma da injeção de padrão misto de (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER na concentração de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  empregando tempo de eluição de 100 s.



**Nota:** Os tempos de retenção da (1) VEN, (2) CIT, (3) PAR (PI), (4) FLUV, (5) DUL, (6) FLUO e (7) SER foram de 6,77; 9,16; 11,07; 12,34; 13,18; 16,01 e 18,70 min, respectivamente.

**Fonte:** Do autor, 2014.

## 5.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

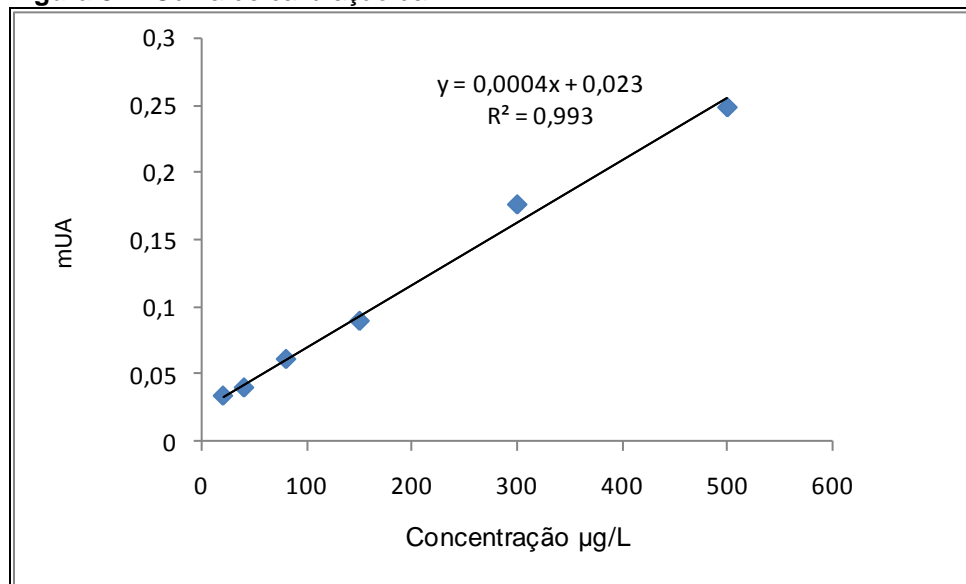
Conforme o FDA<sup>51</sup> os parâmetros avaliados para validação do método foram: linearidade, precisão e exatidão intra-dias e inter-dias, recuperação e seletividade. Assim, curvas analíticas foram construídas na faixa de 20 a  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo esta uma faixa que contém os intervalos terapêuticos de todos os fármacos em estudo, conforme Tabela 2<sup>16, 17, 19, 20, 22, 23, 24</sup>.

**Tabela 2** - Faixa terapêutica dos fármacos em estudo

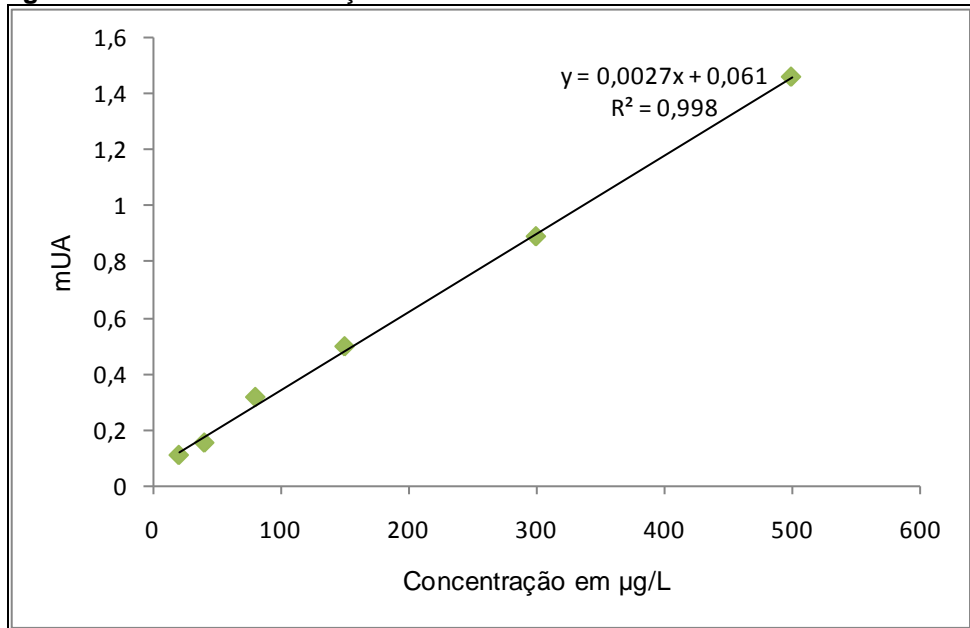
FÁRMACOS	FAIXA TERAPÊUTICA ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
VEN	40 á 150
CIT	20 á 200
PAR	10 á 150
FLUV	50 á 250
DUL	40 á 130
FLUO	50 á 500
SER	50 á 250

**Fonte:** Do autor, 2014.

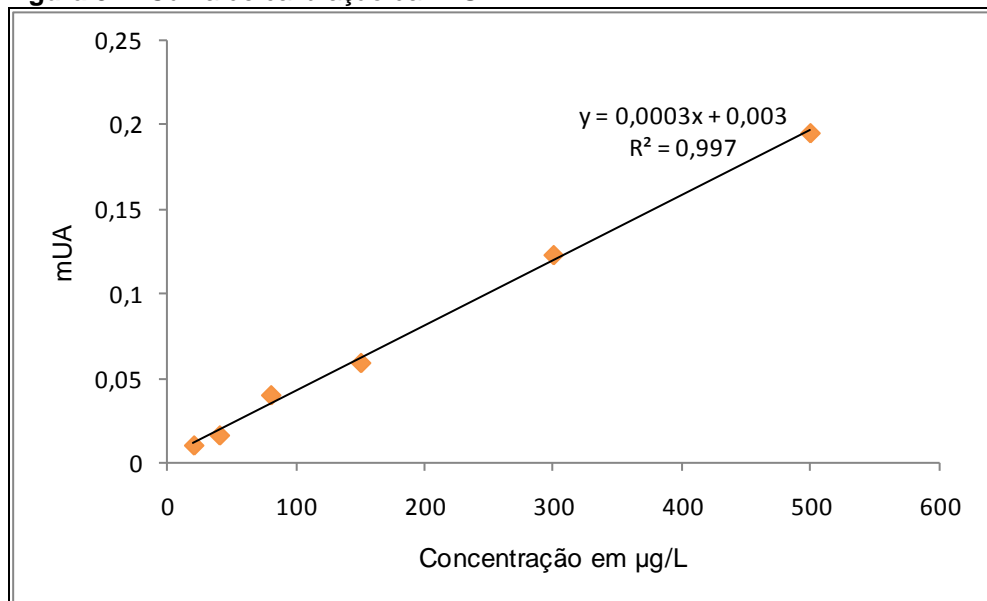
As curvas foram construídas utilizando plasma de seis indivíduos que confirmaram não fazer o uso dos fármacos estudados. A PAR foi empregada como padrão interno porque a mesma apresentava baixa sensibilidade para o método proposto, não sendo possível sua análise com a detectabilidade requerida para monitorização terapêutica. A faixa estudada mostrou-se linear e os coeficientes de correlação encontrados foram maiores que 0,99 para todos os fármacos em estudo. As Figuras 32 a 37 mostram as respectivas curvas calibração para VEN, CIT, FLUV, DUL, FLUO e SER.

**Figura 32** - Curva de calibração da VEN.

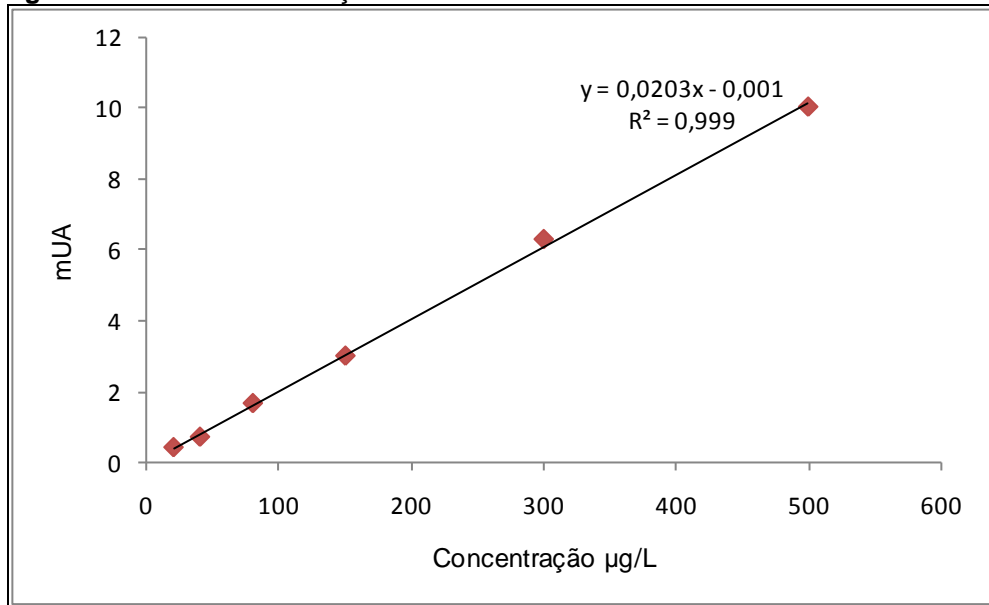
**Fonte:** Do autor, 2014.

**Figura 33** - Curva de calibração do CIT.

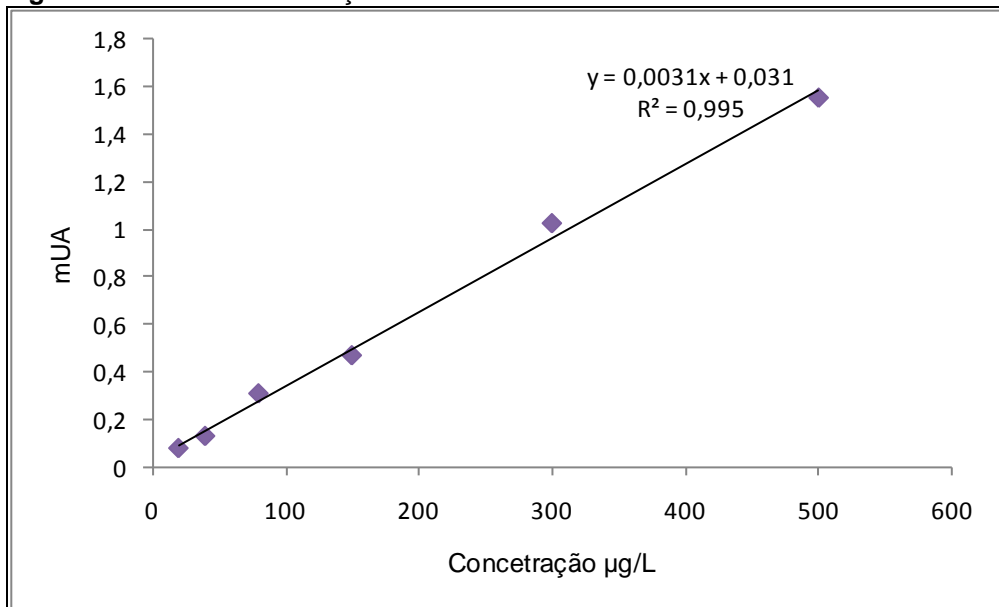
Fonte: Do autor, 2014.

**Figura 34** - Curva de calibração da FLUV.

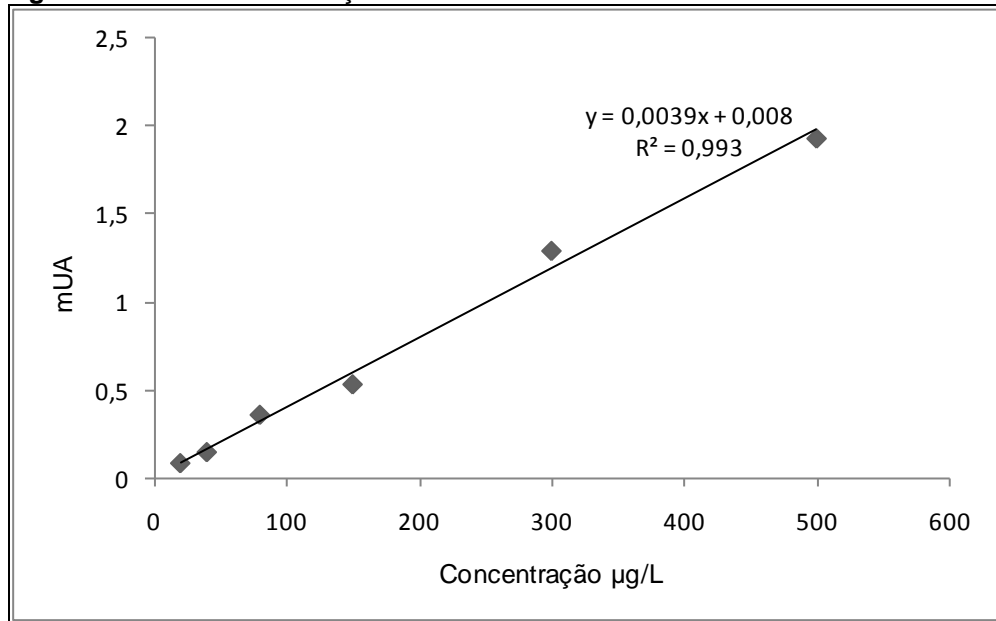
Fonte: Do autor, 2014.

**Figura 35** - Curva de calibração da DUL.

Fonte: Do autor, 2014.

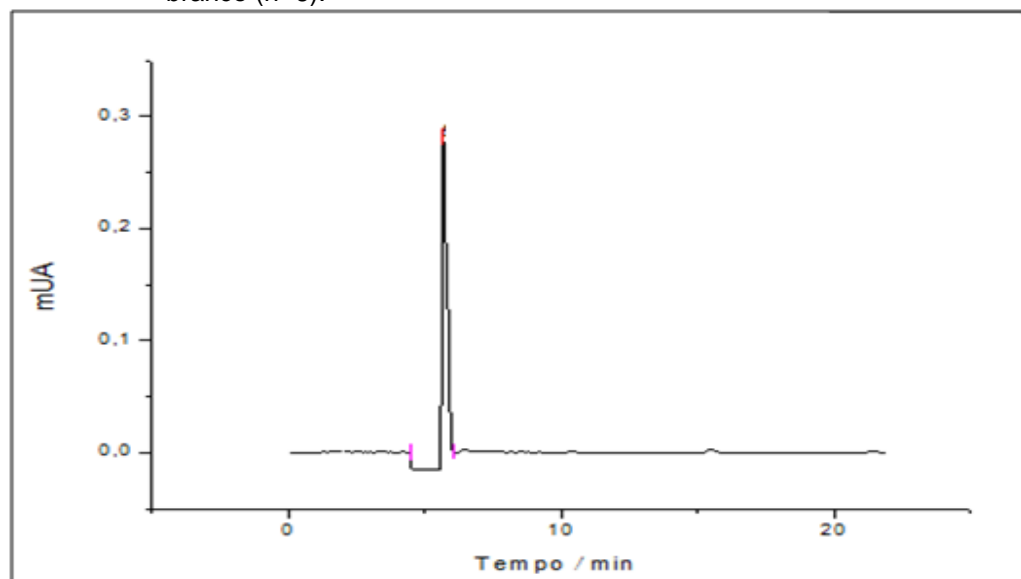
**Figura 36** - Curva de calibração da FLUO.

Fonte: Do autor, 2014.

**Figura 37** - Curva de calibração da SER.

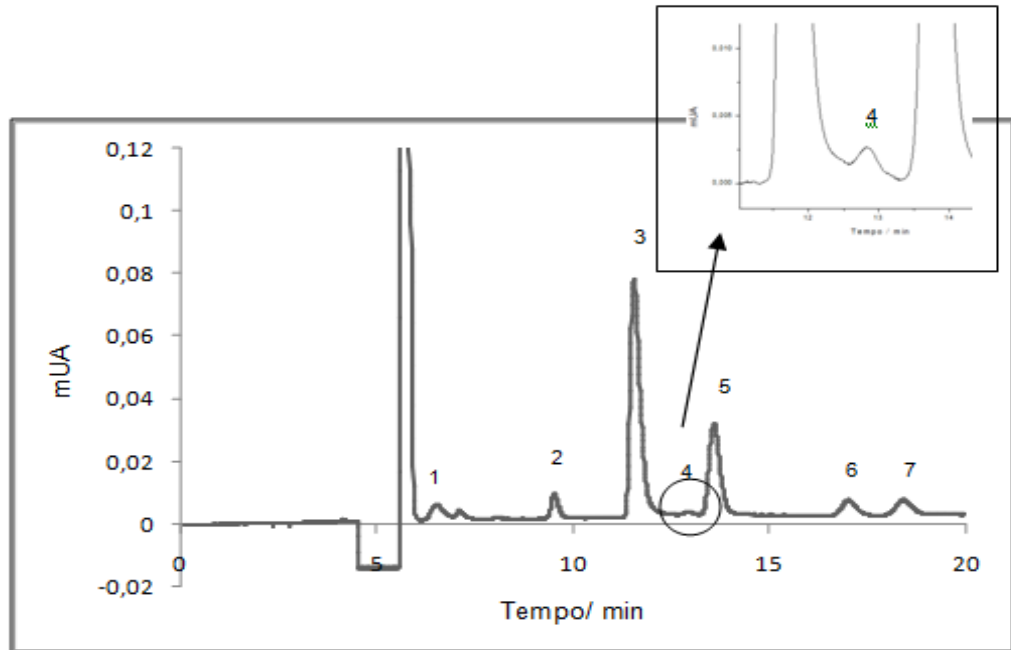
Fonte: Do autor, 2014.

Em termos de seletividade, vale ressaltar que não foi encontrado interferente algum nos tempos de retenção dos analitos, quando da injeção de uma amostra de plasma branco (Figura 38). As Figuras 39 a 41 mostram cromatogramas de injeção de pool de plasma branco fortificado com os padrões de ISRS nas concentrações de 20, 150 e 300  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Estas foram empregadas para a determinação da precisão e exatidão intra e inter-ensaio e recuperação absoluta.

**Figura 38** - Cromatograma representando uma injeção de um pool de plasma humano branco (n=6).

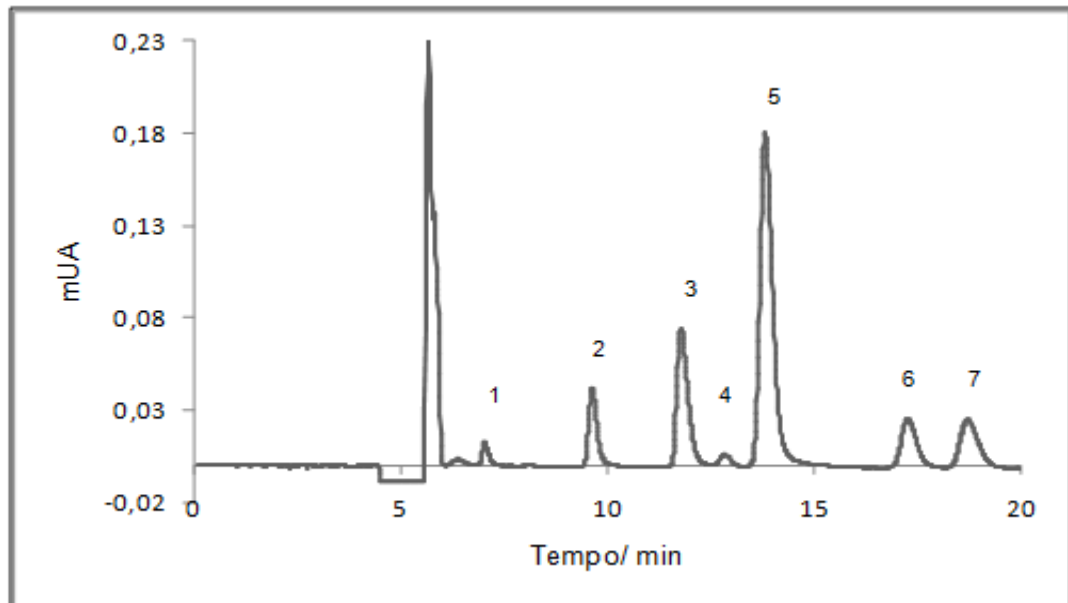
Fonte: Do autor, 2014.

**Figura 39** - Cromatograma obtido pela injeção direta de um padrão misto de VEN (1), CIT (2), FLUV (4), DUL (5), FLUX (6) e SER (7) na concentração de  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  (LiQ) e PAR (PI) (3) na concentração de  $300 \mu\text{g L}^{-1}$ , em pool de plasma branco.



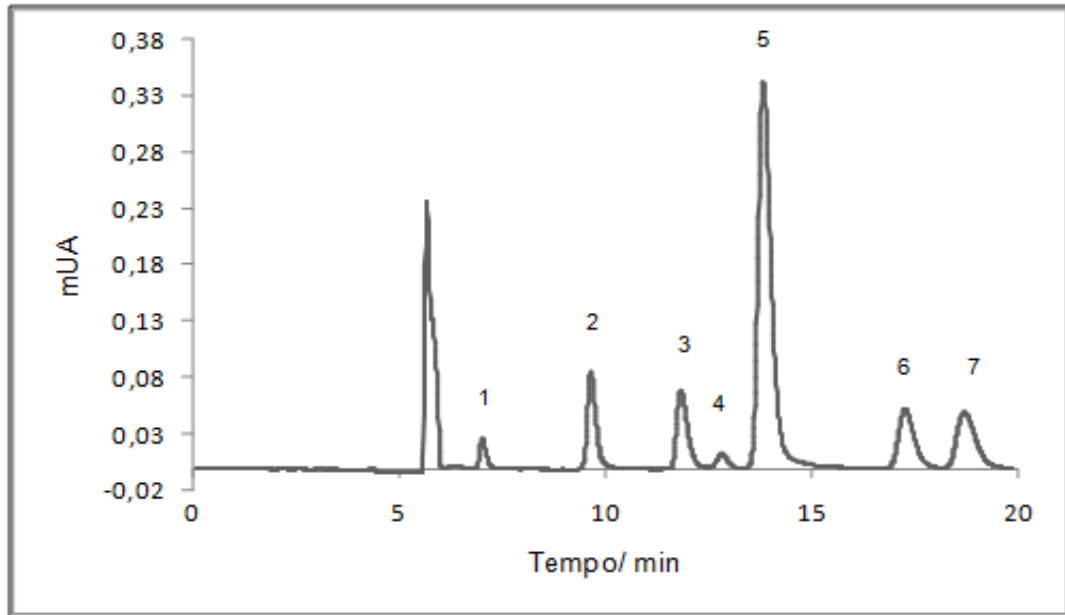
Fonte: Do autor, 2014.

**Figura 40** - Cromatograma obtido pela injeção direta de um padrão misto de VEN (1), CIT (2), FLUV (4), DUL (5), FLUX (6) e SER (7) na concentração de  $150 \mu\text{g L}^{-1}$  e PAR (PI) (3) na concentração de  $300 \mu\text{g L}^{-1}$ , em pool de plasma branco.



Fonte: Do autor, 2014.

**Figura 41** - Cromatograma obtido pela injeção direta de um padrão misto de VEN (1), CIT (2), PAR (PI) (3), FLUV (4), DUL (5), FLUX (6) e SER (7) na concentração de  $300 \mu\text{g L}^{-1}$  em pool de plasma branco.



**Fonte:** Do autor, 2014.

Os testes de precisão e exatidão intra-dias e inter-dias foram realizados em três dias diferentes. A Tabela 3 apresenta os resultados de precisão e exatidão intra-dias, e a Tabela 4 apresenta os resultados de precisão e exatidão inter-dias calculados respectivamente como DPR e E.

**Tabela 3** - Parâmetros de Validação intra-dias e seus respectivos resultados

<b>Precisão (n=6)</b>	<b>Concentração Nominal/ <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>	<b>DPR*/%</b>	<b>Concentração Analisada</b>	<b>E**/%</b>
<b>VEN</b>	20,0	14,47	20,57	2,86
	150,0	7,10	141,24	-5,83
	300,0	9,52	295,94	-1,35
<b>CIT</b>	20,0	11,06	16,30	-18,46
	150,0	10,67	155,26	3,50
	300,0	10,41	295,94	-1,35
<b>FLUV</b>	20,0	10,68	16,80	-15,96
	150,0	7,18	143,21	-4,52
	300,0	9,42	308,58	2,86
<b>DUL</b>	20,0	3,94	20,48	2,41
	150,0	6,39	147,87	-1,41
	300,0	5,32	310,21	3,40
<b>FLUO</b>	20,0	6,15	16,16	-19,18
	150,0	11,97	141,55	-5,63
	300,0	10,09	320,06	6,68
<b>SER</b>	20,0	6,32	18,87	-5,61
	150,0	11,97	132,89	-11,4
	300,0	5,10	325,98	8,66

\*Desvio padrão relativo dado em %, \*\*Erro relativo dado em %.

Fonte: Do autor, 2014.

**Tabela 4** - Parâmetros de Validação inter-dias e seus respectivos resultados

<b>Precisão (n=6)</b>	<b>Concentração Nominal/ <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>	<b>DPR*/%</b>	<b>Concentração Analisada</b>	<b>E**/%</b>
<b>VEN</b>	20,0	10,03	16,97	-15,1
	150,0	13,19	155,63	3,75
	300,0	1,07	297,38	-0,87
<b>CIT</b>	20,0	1,59	17,13	-14,32
	150,0	12,92	155,34	3,56
	300,0	1,91	297,51	-0,82
<b>FLUV</b>	20,0	0,30	20,67	3,38
	150,0	1,27	148,73	-0,84
	300,0	1,37	300,58	0,19
<b>DUL</b>	20,0	9,64	17,04	-14,79
	150,0	1,32	155,52	3,68
	300,0	6,65	297,43	-0,85
<b>FLUO</b>	20,0	4,32	16,55	-17,2
	150,0	6,31	156,42	4,28
	300,0	2,59	297,01	-0,99
<b>SER</b>	20,0	3,79	16,04	-19,76
	150,0	3,05	157,37	4,91
	300,0	4,034	296,57	-1,14

\*Desvio padrão relativo dado em %, \*\*Erro relativo dado em %.

Fonte: Do autor, 2014.

O método mostrou-se preciso e exato de acordo com as recomendações do FDA (DPR < 15% e -15%<E<15%, para o LQ e DPR <20% e -20%<E<20% para os demais pontos), para todos os padrões analisados.

O limite de quantificação para todos os analitos foi definido como  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  sendo este a menor concentração que pode ser determinada com precisão e exatidão. O limite de detecção do método para todos os fármacos foi de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Os resultados da recuperação aparente estão demonstrados na Tabela 5:

**Tabela 5 – Recuperação absoluta e seus respectivos resultados**

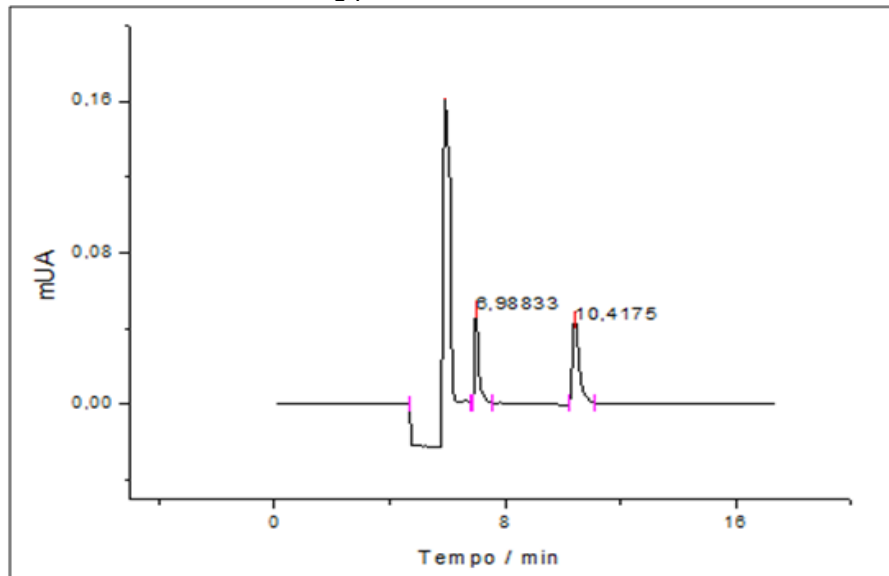
<b>Fármacos (n=3)</b>	<b>Concentração Nominal/ <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>	<b>Recuperação Absoluta/ %</b>
<b>VEN</b>	20,0	87,32
	150,0	87,01
	300,0	86,61
<b>CIT</b>	20,0	93,47
	150,0	88,51
	300,0	85,95
<b>PAR</b>	20,0	88,98
	150,0	85,72
	300,0	91,51
<b>FLUV</b>	20,0	85,27
	150,0	86,31
	300,0	88,99
<b>DUL</b>	20,0	86,14
	150,0	85,07
	300,0	87,21
<b>FLUO</b>	20,0	86,05
	150,0	83,09
	300,0	85,78
<b>SER</b>	20,0	89,23
	150,0	87,07
	300,0	86,64

**Fonte:** Do autor, 2014.

## 6 APLICAÇÃO DO MÉTODO NAS AMOSTRAS REAIS

Após a definição da metodologia e análise o método foi aplicado na análise de fármacos antidepressivos ISRS (n=2). As amostras analisadas foram adquiridas de pacientes que relataram fazer uso dos fármacos em estudo. As Figuras 42 a 47 mostram os cromatogramas das amostras analisadas empregando o método desenvolvido.

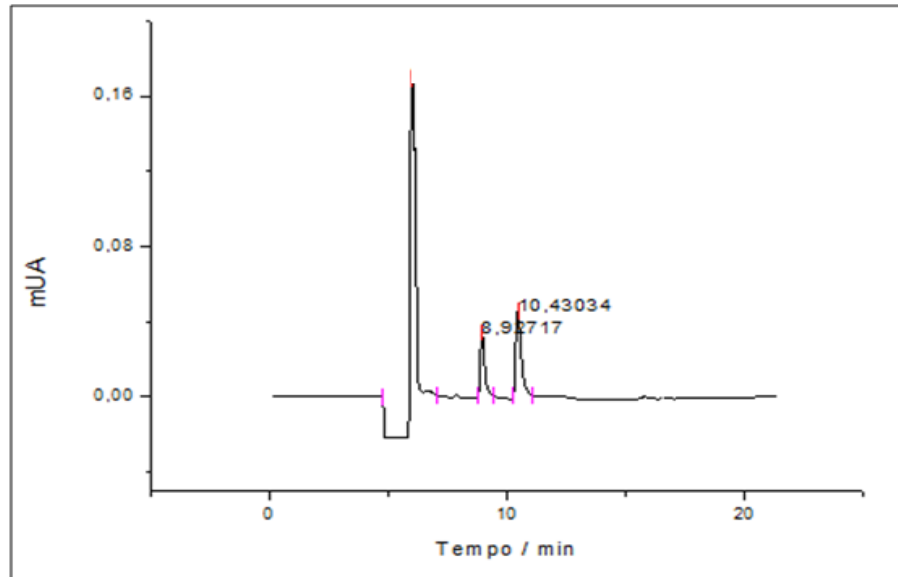
**Figura 42** - Cromatograma referente ao plasma de paciente que fazia uso de 75 mg por dia de VEN há 6 meses de tratamento.



**Nota:** Concentração plasmática encontrada foi  $132,49 \mu\text{g L}^{-1}$ . Tempo de retenção da VEN 6,98 min e PAR (PI) 10,41 min.

**Fonte:** Do autor, 2014.

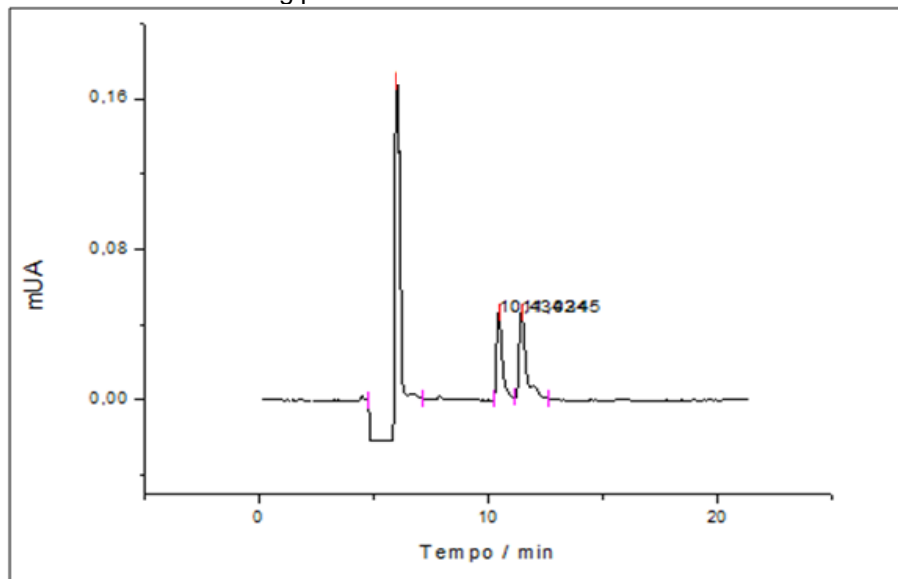
**Figura 43** - Cromatograma referente ao plasma de paciente que fazia uso de 20 mg por dia de CIT há 11 meses de tratamento.



**Nota:** Concentração plasmática encontrada  $62,26 \mu\text{g L}^{-1}$ . Tempo de retenção do CIT 8,92 min e PAR (PI) 10,43 min.

**Fonte:** Do autor, 2014.

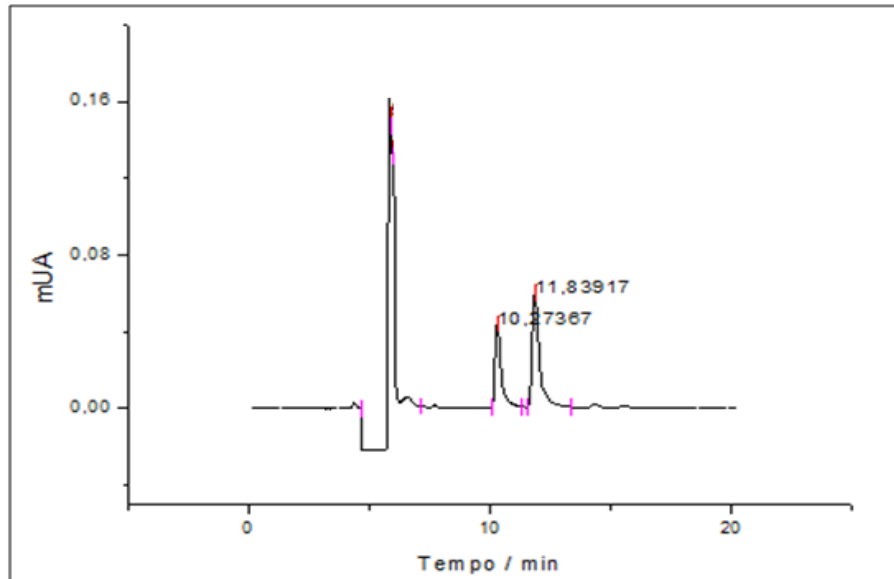
**Figura 44** - Cromatograma referente ao plasma de paciente que fazia uso de 100 mg por dia de FLUV há 4 meses de tratamento.



**Nota:** Concentração plasmática encontrada  $138,45 \mu\text{g L}^{-1}$ . Tempo de retenção da FLUV 10,82 min e PAR (PI) 10,14 min.

**Fonte:** Do autor, 2014.

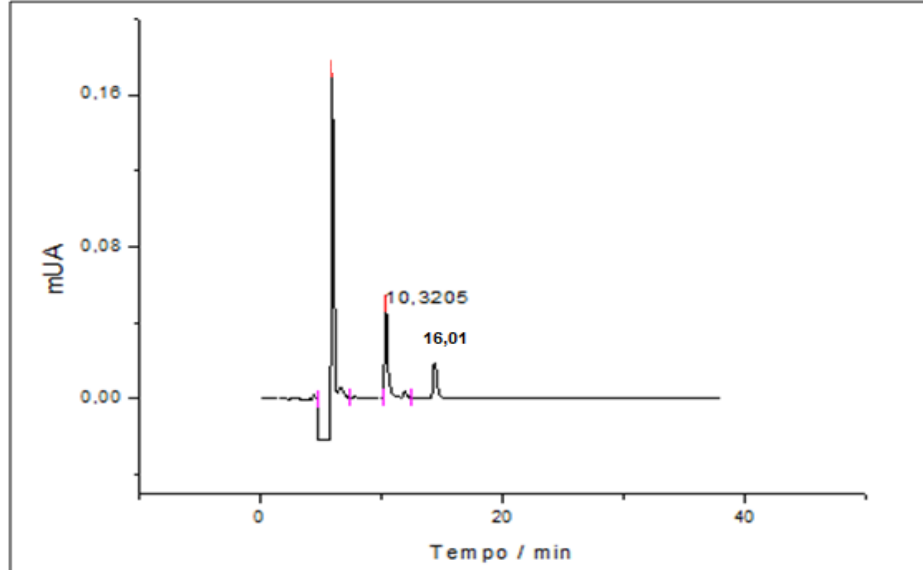
**Figura 45** - Cromatograma referente ao plasma de paciente que fazia uso de 60 mg por dia de DUL há 5 meses de tratamento.



**Nota:** Concentração plasmática encontrada  $116,15 \mu\text{g L}^{-1}$ . Tempo de retenção da DUL 11,83 min e PAR (PI) 11,83 min.

**Fonte:** Do autor, 2014.

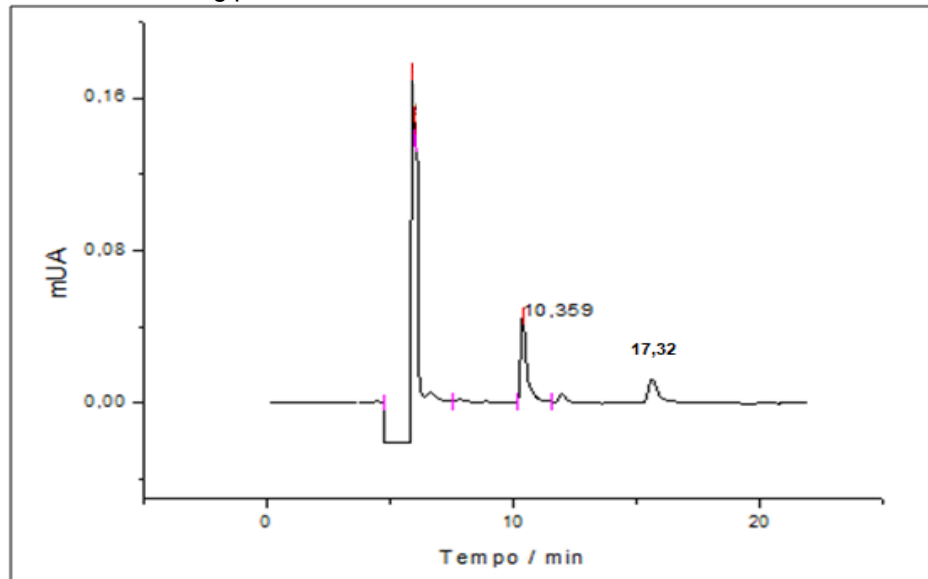
**Figura 46** - Cromatograma referente ao plasma de paciente que fazia uso de 20 mg por dia de FLUO há dois anos de tratamento.



**Nota:** Concentração plasmática encontrada  $88,89 \mu\text{g L}^{-1}$ . Tempo de retenção da FLUO 16,01 min e PAR (PI) 10,32 min.

**Fonte:** Do autor, 2014.

**Figura 47** - Cromatograma referente ao plasma de paciente que fazia uso de 50 mg por dia de SER há 8 meses de tratamento.



**Nota:** Concentração plasmática encontrada 78,12  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Tempo de retenção da SER 17,32 min e PAR (PI) 10,35 min.

**Fonte:** Do autor, 2014.

As amostras analisadas apresentaram concentração plasmática dentro da faixa terapêutica conforme descrito no item 2.1.1 para todos os fármacos em estudo.

## 7 CONCLUSÃO

Um RAMIP-BSA seletivo a antidepressivos ISRS foi desenvolvido e aplicado na extração direta desses fármacos em amostras de plasma humano. Através de vários testes pôde-se comprovar que o RAMIP-BSA apresenta uma boa capacidade de pré-concentração da molécula modelo, bem como de outras moléculas da mesma classe, além de uma surpreendente capacidade de eliminar macromoléculas. Amostras de plasma humano foram injetadas diretamente no sistema sem nenhum tratamento prévio, não resultando em nenhum problema de entupimento e perda de resolução, atestando a capacidade de eliminação de macromoléculas. O método foi validado de acordo com as normas do FDA e todos os testes apresentaram resultados para linearidade, precisão e exatidão intra-dias e inter-dias, recuperação da extração e seletividade dentro das especificações.

Pode-se observar que o polímero apresentou longa vida útil, possibilitando sua reutilização por vários ciclos. Os polímeros foram caracterizados através de MEV e IR.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- <sup>1</sup> WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em: 20 Ago. 2012.
- <sup>2</sup> MERIKANGAS et al. Lifetime prevalence of mental disorders in U.S. adolescents: results from the National Comorbidity Survey Replication — Adolescent Supplement (NCS-A). **J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry**, n. 49, p. 980–989, 2010.
- <sup>3</sup> BYERS et al. High occurrence of mood and anxiety disorders among older adults: the National Comorbidity Survey Replication. **Arch. Gen. Psychiatry**, n. 67, p. 489 – 496, 2010.
- <sup>4</sup> KESSLER et al. Age differences in the prevalence and co-morbidity of DSM-IV major depressive episodes: results from the WHO World Mental Health Survey Initiative. **Depress Anxiety**, n. 27, p. 351–364, 2010.
- <sup>5</sup> MULLETT, W. M. J. Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis. **J. Biochem. Bioph. Meth.**, n.70, p. 263–273, 2007.
- <sup>6</sup> SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis, **J. Chromatogr. B**, v. 801, p. 141-156, 2004.
- <sup>7</sup> HE et al. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples. **J. Biochem. Bioph. Meth.**, n. 70, p. 133–150, 2007.
- <sup>8</sup> ANDERSSON, L. I. Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field. **J. Chromatogr. B**, v. 745, p.3-13, 2000.
- <sup>9</sup> YIM, D. S.; JEONG, J. E.; PARK, J. Y. Assay of omeprazole and omeprazole sulfone by semi-microcolumn liquid chromatography with mixed-function precolumn, **J. Chromatogr. B**, v. 754, p.487-493, 2001.
- <sup>10</sup> HAGINAKA et al. Uniform-sized molecularly imprinted polymer for (S)-naproxen selectively modified with hydrophilic external layer, **J. Chromatogr. A**, v. 849, p.331-339, 1999.

<sup>11</sup> BAHREMAND et al. The role of 5-HT<sub>3</sub> receptors in the additive anticonvulsant effects of citalopram and morphine on pentylenetetrazole-induced clonic seizures in mice. **Epilepsy Behav.**, n. 21, p.122–127, 2011.

<sup>12</sup> VU et al. 3-(Arylamino)-3-phenylpropan-2-olamines as a new series of dual norepinephrine and serotonin reuptake inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.19, p. 2464–2467, 2009.

<sup>13</sup> OWENS et al. Neurotransmitter receptor and transporter binding profile of antidepressants and their metabolites. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 283, p. 1305-1322, 1997.

<sup>14</sup> FEIJO, F. M.; BERTOLUCCI, M. C.; REIS, C. Serotonina e controle hipotalâmico da fome: uma revisão. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 57, p. 74 – 77, 2011.

<sup>15</sup> BUNDGAARD et al. Mechanistic model of acute autoinhibitory feedback action after administration of SSRIs in rats: Application to escitalopram-induced effects on brain serotonin levels. **J. Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 29, p. 394–404, 2006.

<sup>16</sup> GOODMAN & GILMAN. **As Bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: MC Graw Hill, 2005.

<sup>17</sup> MOFFAT A. C.; OSSELTON M. D.; WIDDOP B. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**. 4. Ed. Pharma. Press, 2011.

<sup>18</sup> P.R. VADE-MÉCUM. Disponível em: <<http://www.prvademecum.com>>. Acesso em: 20 set. 2012.

<sup>19</sup> U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH, CITALOPRAM. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/>>. Acesso em: 15 Dec. 2012.

<sup>20</sup> THE DRUGS.COM INTERNATIONAL DRUG NAME. Disponível em: <<http://www.drugs.com/international/>>. Acesso em 13 Dec. 2012.

<sup>21</sup> LEIS, J. H.; WINDISCHHOFER, W.; FAULER, G. Improved sample preparation for the quantitative analysis of paroxetine in human plasma by stable isotope dilution negative ion chemical ionisation gas chromatography–mass spectrometry. **J. Chromatogr. B**, v.779, p. 353–357, 2002.

<sup>22</sup> U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH. Fluvoxamine. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/>>. Acesso em: 15 Dec. 2012.

<sup>23</sup> U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH. Duloxetine. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/>>, Acesso em 15 Dec. 2012.

<sup>24</sup> U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH. Sertraline. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/>>, Acesso em 15 Dec. 2012.

<sup>25</sup> ANDERSSON, H. S. AND NICHOLLS I. A. **A historical perspective of the development of molecular imprinting in:** Sellergren, B. Molecularly Imprinted Polymers – Man-made mimics of antibodies their applications in analytical chemistry. Germany: Johannes Gutenberg University Mainz, p. 1–19, 2003.

<sup>26</sup> FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B.; ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Bra. J. Pharmaceut. Sci.**, v. 44, p. 361-375, 2008.

<sup>27</sup> TAMAYO, F.G.; TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. **J. Chromatogr. A**, n.1152, p. 32–40, 2007.

<sup>28</sup> BERGMANN, N. M.; PEPPAS, N. A. Molecularly imprinted polymers with specific recognition for macromolecules and proteins. **Prog. Polym. Sci.**, v.33, p. 271-288, 2008.

<sup>29</sup> DIAS et al. Molecularly imprinted polymer as a solid phase extractor in flow analysis. **Talanta**, n. 76, p. 988–996, 2009.

<sup>30</sup> TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP (“MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS”) em técnicas de extração e separação. **Quim. Nova**, v. 28, p. 1076-1086, 2005.

<sup>31</sup> GUO et al. Protein-imprinted polymer with immobilized assistant recognition polymer chains, **Biomaterials**, v. 27, p.4381-4387, 2006.

- <sup>32</sup> CORMACK, P. A. G.; ELORZA, A. Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization, **J. Chromatogr. B**, v. 804, p. 173-182, 2004.
- <sup>33</sup> KILLGORE, J. K.; VILLASEÑOR, S. R. Systematic approach to generic matrix elimination via "heart-cut" column-switching techniques. **J. Chromatogr. A**, v. 739, p. 43-48, 1996.
- <sup>34</sup> HU, C. H.; CHOU, T. C. Albumin molecularly imprinted polymer with high template affinity — Prepared by systematic optimization in mixed organic/aqueous media, **Microchem. J.** n.91, p. 53–58, 2009.
- <sup>35</sup> DESILETS, C. P.; ROUNDS, M. A.; REGNIER, F. E. Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography, **J. Chromatogr. A**, v. 544, p. 25, 1991.
- <sup>36</sup> SADÍLEK, P.; SATÍNSKÝ, D.; SOLICH, P. Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices. **Trac-trends Anal.Chem.**, Vol. 26, p. 375-384, 2007.
- <sup>37</sup> RIEUX, L.; BISCHOFF, R.; VERPOORTE, E. Restricted-access material-based high-molecular-weight protein depletion coupled on-line with nano-liquid chromatography-mass spectrometry for proteomics applications. **J. Chromatogr. A**, v. 1149, p. 169-177, 2007.
- <sup>38</sup> MACHTEJEVAS et al. Sulphonic acid strong cationexchange restricted access columns in sample cleanup for profiling of endogeneous peptides in bidimensional liquid chromatography Structure and function of strong cation-exchange restricted access materials, **J. Chromatogr. A**, v. 1123, p.38-46, 2006.
- <sup>39</sup> WANG et al. Synthesis of a novel restricted access chiral stationary phase based on atom transfer radical polymerization and click chemistry for the analysis of chiral drugs in biological matrices. **J. Chromatogr. A**, v.1218, p.1310-1313, 2011.
- <sup>40</sup> LIMA, V. V.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Desenvolvimento de colunas cromatográficas de meios de acesso restrito proteína imobilizada e suas avaliações para análise de fármacos com injeção direta de plasma humano. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 72-78, 2006.
- <sup>41</sup> CASSIANO et al. Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography. **Anal. Bioanal. Chem**, n. 384, p. 1462–1469, 2006.

- <sup>42</sup> HAGINAKA, J.; SAMBE, H. Uniform-sized molecularly imprinted polymers for 2-arylpropionic acid derivatives selectively modified with hydrophilic external layer and their applications to direct serum injection analysis. **Anal. Chem.**, v. 72, p. 5206-5210, 2000.
- <sup>43</sup> HOSHINA et al. Molecularly imprinted polymers for simultaneous determination of antiepileptics in river water samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. of Chromatography A**, v. 1216, p. 4957-4962, 2009.
- <sup>44</sup> HOSHINA et al. Simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in river water samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using molecularly imprinted polymers as a pretreatment column. **J. of Pharma. and Biom. Anal.**, v. 55, p. 916-922, 2011.
- <sup>45</sup> SAMBE, H.; HAGINAKA, J. Restricted access media-molecularly imprinted polymer for propranolol and its application to direct injection analysis of b-blockers in biological fluids. **Analyst**, v. 128, p. 593-597, 2003.
- <sup>46</sup> SAMBE et al. Simultaneous determination of bisphenol A and its halogenated derivatives in river water by combination of isotope imprinting and liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr A**, v. 1134, p. 16-23, 2006.
- <sup>47</sup> ANTONIO, P.; ILHA, K.; SUARE-ILHA, K. Adsorption of di-2-pyridyl ketone salicyloylhydrazone on silica gel: characteristics and isotherms. **Talanta**, v. 64, p.484-490, 2004.
- <sup>48</sup> PUOCI et al. New restricted access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective recognition/release in water media. **Eur. Polym. J.**, v. 45, p.1634-1640, 2009.
- <sup>49</sup> HUA et al. Surface hydrophilic modification with a sugar moiety for a uniform-sized polymer molecularly imprinted for phenobarbital in serum. **Acta Biomaterial**, v. 7, p. 3086-3093, 2011.
- <sup>50</sup> MORAES et al. A new restricted access molecularly imprinted polymer capped with albumin for direct extraction of drugs from biological matrices: the case of chlorpromazine in human plasma. **Anal. Bioanal. Chem**, v. 405, p. 7687-7696, 2013.

- <sup>51</sup> UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US FDA), **Guidance for Industry. Bioanalytical method validation**. Rockville: FDA Center for Drug Evaluation and Research, 2001.
- <sup>52</sup> TOTH, B.; LASZLO, K.; HORVAI, G. Chromatographic behavior of silica–polymer composite molecularly imprinted materials. **J. Chromatography A**, v. 1100, p. 60-67, 2005.
- <sup>53</sup> SILVA B. 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). **J. of Anal. Toxicology**, vol 31, July, August, 2007.
- <sup>54</sup> CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. **Resolução 196/96**: Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Brasília, DF, versão 2012.
- <sup>55</sup> COELHO, T. L. **Estudos de adsorção de Cobre (II) em microesferas de quitosana reticuladas com epiclorigrina e impregnadas com heparina**. 2006. 73f. Dissertação (Mestrado em química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- <sup>56</sup> DABROWSKI, A. Adsorption - from theory to practice. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 93, p. 135-224, 2001.
- <sup>57</sup> BARROS & ARROYO. **Métodos de Remoção de Cromo de Águas Residuais: Métodos de Adsorção**. 2001. 73f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2001.
- <sup>58</sup> MEZZARI, I. A. **Utilização de carvões adsorventes para o tratamento de efluentes contendo pesticidas**. 2002. 92f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.
- <sup>59</sup> MORENO-CASTILLA, C. Adsorption of organic molecules from aqueous solutions on carbon materials. **Carbon**, v. 42; p. 83-94, 2004.
- <sup>60</sup> AROGUZ, A. Z. Kinetics and thermodynamics of adsorption of azinphosmethyl from aqueous solution onto pyrolyzed (at 600 degrees C) ocean peat moss (*Sphagnum* sp.). **Journal of Hazardous Materials B**, v. 135, p. 100-105, 2006.
- <sup>61</sup> HASANY, S. M.; SEED, M. M.; AHMED, M. Sorption of traces of silver ions onto polyurethane foam from acidic solution. **Talanta**, v. 54, p. 89-98, 2001.

<sup>62</sup> GREGG S. J.; SING K. S. W. **Adsorption, surface area and porosity**. 2. ed. London: Academic Press, 1982.

<sup>63</sup> RADHIKA M., PALANIVELU K. Adsorptive removal of chlorophenols from aqueous solution by low cost adsorbent — Kinetics and isotherm analysis. **J. Hazard. Mater**, v 138; p. 116 – 124, 2006.

<sup>64</sup> MARESTONI et al. Polímeros impressos com íons: Fundamentos, estratégias de preparos e aplicações em química analítica. **Quim. Nova**, v. 36, n 8, p. 1194-1207, 2013.

<sup>65</sup> CARIS J. A., CHAVES R. A., QUEIROZ M. E. C. Evaluation of Solid-Phase Microextraction using a Polythiophene Film and Liquid Chromatography with Spectrophotometric Detection for the Determination of Antidepressants in Plasma Samples. **J. Braz. Chem. Soc.**, vol. 23, n. 1, p. 57-64, 2012.

## ANEXO A

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Grupo A)

**Dados sobre a pesquisa**

**Título do projeto:** “Emprego de polímeros de impressão molecular restritos à ligação com macromoléculas por meio de revestimento com albumina para a extração direta de antidepressivos inibidores da recaptação de serotonina em plasma humano seguido por HPLC”.

**Pesquisador:** Katrine Kyona Muniz Sirgom da Silva

**Cargo/função:** Mestranda do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Unifal-MG

**Avaliação do risco da pesquisa:** sem riscos previsíveis para os doadores

Meu nome é Katrine Kyona Muniz Sirgom da Silva e atualmente sou aluna de mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Unifal-MG onde trabalho no desenvolvimento de metodologias analíticas para a quantificação de fármacos antidepressivos inibidores seletivos da receptação de serotonina em amostras biológicas.

Para a continuação desse trabalho, necessito que o(a) senhor(a) concorde em responder a um breve questionário que abrange alguns dados pessoais, bem como seu histórico quanto à presença de doenças e uso de tratamentos medicamentosos. Além disso, será necessária a doação de 5 mL de sangue para as análises. Concordando em participar dessa pesquisa, a amostra de sangue será retirada por mim, em uma sala apropriada do Laboratório de análises de toxicantes e fármacos da Unifal-MG.

É garantido o **sigilo absoluto** de sua identidade na apresentação dos resultados obtidos durante a pesquisa. Caso haja interesse, eu poderei lhe fornecer o resultado individual da análise do seu sangue. Não haverá benefício financeiro ou de qualquer outro tipo. O desconforto e risco possível da participação se referem à coleta de sangue à qual será feita por pessoa qualificada e seguindo todas as normas de segurança para tal conduta. É também garantido que o(a) senhor(a) pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem prejuízos, e que as amostras coletadas não serão utilizadas para outros fins (elas somente serão utilizadas de acordo com os objetivos deste trabalho).

O(a) senhor(a) receberá uma cópia deste documento e eu me colocarei à disposição para eventuais esclarecimentos antes, durante e após a pesquisa.

Declaro que, depois de esclarecido(a) pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, concordo em participar desse Projeto de Pesquisa.

Alfenas, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2012.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do(a) Doador(a)

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

Para maiores informações, dúvidas e esclarecimentos sobre a pesquisa, falar com Katrine Kyona Muniz da Silva - telefone: (35) 3299-1342; e-mail: katrinekyona@hotmail.com; endereço: Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos (D301), Unifal-MG, Alfenas, MG.

## ANEXO B

### FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS

**TODOS OS GRUPOS:**

1) Identificação do caso da pesquisa: Grupo/Número: \_\_\_\_\_ (a ser preenchido pelo pesquisador)

2) Idade: \_\_\_\_\_ anos

3) É fumante? ( ) sim ( ) não

Caso sim, há quanto tempo? \_\_\_\_\_

Quantos cigarros por dia? \_\_\_\_\_

4) Consome bebida alcoólica? ( ) sim ( ) não

Caso sim, há quanto tempo? \_\_\_\_\_

Qual a frequência? \_\_\_\_\_

5) Possui alguma doença? ( ) sim ( ) não

Caso sim, qual (is)?

---



---

6) Faz uso de medicamentos? ( ) sim ( ) não

Caso sim: Qual (is)?

---



---

Qual a dose? \_\_\_\_\_

Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

Outras observações ou comentários:

---



---



---