



Amitriptilina e Nortriptilina em Plasma: Extração em Fase Sólida por Polímeros de Impressão Molecular e Sílica Octadecila para Análise Cromatográfica em Fase Líquida de Alta Resolução

Maria B. FREITAS*, Pollyana R. COSTA, Joyce O. BRITO, Elisabeth P. VIEIRA,
Patrícia P. MAIA & Maria Elisa P.B. SIQUEIRA

Laboratório de Análises Toxicológicas, Universidade Federal de Alfenas,
Rua Gabriel Monteiro da Silva 714, 37130-000 Alfenas – MG, Brasil

RESUMO. As ormosílicas (sílicas organicamente modificadas) são materiais de impressão molecular (MIS) que têm surgido como sorventes mais seletivos para a extração em fase sólida (SPE). Nesta pesquisa foi avaliado o desempenho do MIS em SPE (MISPE) e da sílica octadecila (C18) SPE no preparo de amostra para a análise da amitriptilina (AMI) e nortriptilina (NOR) em plasma. Foram estabelecidas as melhores condições de uso de ambos sorventes em SPE, sendo as análises conduzidas em cromatógrafo a líquido com detector de ultravioleta. Nas condições utilizadas na síntese do MIS e de sua aplicação em MISPE, não foi verificada resposta satisfatória na análise cromatográfica dos antidepressivos, principalmente devido à baixa repetitividade dos resultados nas concentrações de interesse. Para a AMI e NOR, a extração usando SPE C18 apresentou melhores resultados e este método foi validado e aplicado na análise de amostras reais de dois pacientes tratados com AMI.

SUMMARY. “Amitriptyline and Nortriptyline in Plasma: Solid-Phase Extraction in Molecularly Imprinted Polymers and Silica Octadecyl for High Performance Liquid Chromatography Analysis”. The ormosils (sílica organically modified) are molecularly imprinted materials (MIS) that have appeared as new selective sorbents for solid-phase extraction (SPE). This research aimed the evaluation of the performance of MIS in SPE (MISPE) and of the silica octadecyl (C18) SPE in the sample preparation for liquid chromatographic analysis of amitriptyline (AMI) and nortriptyline (NOR) in plasma. The optimization of the SPE variables were established and the analysis were performed using a HPLC system with UV detection. Under the conditions used for the synthesis of MIS and its application in MISPE, there was no satisfactory response in the chromatographic analysis of the antidepressants, mainly due to the low repeatability of the results in the concentration range of concern. For AMI and NOR, the extraction using SPE C18 offered better results and this method was validated and applied to the analysis of real samples of plasma from two patients under AMI treatment.

INTRODUÇÃO

Os antidepressivos tricíclicos (ADT) constituem uma classe de fármacos para os quais se recomenda a monitorização terapêutica por apresentarem ampla variação interindividual na farmacocinética, estreita faixa terapêutica, presença de metabólitos ativos, além de pobre correlação entre a dose administrada e a resposta terapêutica¹. A análise destes antidepressivos em material biológico é de interesse nesta situação bem como na investigação do agente causal

de intoxicações agudas e/ou letais (aspecto forense) como também em estudos de biodisponibilidade quando da proposição de novas formulações e/ou formas farmacêuticas desses fármacos.

Os ADT apresentam em sua estrutura química comum três anéis, sendo o anel central com sete ou oito átomos de carbono, uma cadeia lateral e um grupo amina terminal (Fig. 1).

Pertencem à classe dos ADT: a amitriptilina (AMI), a imipramina (IMI), a doxepina (DOX) e

PALAVRAS CHAVE: Amitriptilina, HPLC, Nortriptilina, Polímeros de Impressão Molecular, Preparo de amostra, SPE.

KEY WORDS: Amitriptyline, HPLC, Molecularly Imprinted Polymer, Nortriptyline, Sample preparation, SPE.

* Autor a quem correspondência deve ser enviada: E-mail: betanialf@hotmail.com

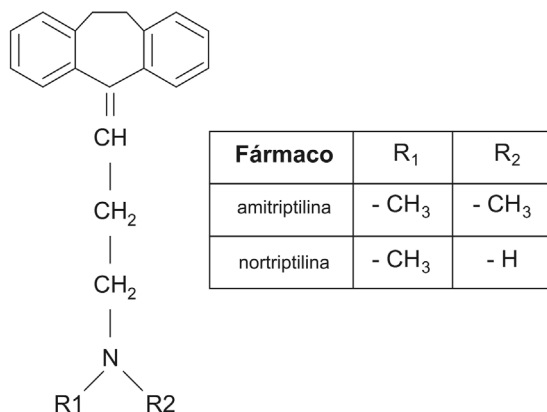


Figura 1. Estrutura química dos antidepressivos tricíclicos amitriptilina e nortriptilina.

a clomipramina (CLOMI) que são conhecidas como aminas terciárias devido à presença de dois grupamentos metílicos ligados ao átomo de nitrogênio da cadeia lateral. Outros ADT como desipramina (DESI), nortriptilina (NOR) e protriptilina (PROT) são conhecidos como aminas secundárias devido a um átomo de hidrogênio em substituição ao grupo metílico na cadeia lateral ².

O desenvolvimento de métodos analíticos mais sensíveis e seletivos, desde preparo de amostra até identificação e quantificação das espécies de interesse, permite a obtenção de dados confiáveis para acompanhamento clínico no uso do fármaco ³. As principais técnicas usadas na preparação de amostras biológicas para a análise cromatográfica de fármacos são a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE). As novas tendências na preparação de amostras para análises clínica e farmacêutica abordam o reconhecimento molecular como a extração baseada na imunoafinidade e em polímeros de impressão molecular (MIP). A partir desses materiais é possível remover o analito de interesse da amostra eliminando a maioria dos interferentes, tais como, proteínas, sais, ácidos, bases e outros compostos orgânicos com propriedades similares aos analitos ⁴.

Os materiais de impressão molecular são estáveis para armazenagem a longo prazo, são de fácil preparo e econômicos ⁴. O potencial deste material é alto, uma vez que oferecem resistência mecânica e às altas temperaturas e pressão e são inertes frente a condições extremas de ácidos, bases, íons metálicos e solventes orgânicos ⁵⁻⁸. Os MIP são materiais poliméricos sintéticos que possuem cavidades específicas desenhadas para uma molécula molde envolvendo um me-

canismo de retenção baseado no reconhecimento molecular.

Materiais híbridos orgânico-inorgânico baseados em sílica organicamente modificada (MIS) vêm sendo usados recentemente como material de impressão molecular e são preparados por hidrólise controlada de grupos aquil silanóxidos através da rota sintética sol-gel descrita inicialmente por Brinker & Scherer ⁹, e que envolve a transição do sistema de sol líquido para fase gel sólida. A impressão sol-gel forma polímeros através da hidrólise e condensação de monômeros silanos por catálise ácida ou básica. Em 2006, Silva & Augusto ¹⁰ relataram o potencial de ormosils preparadas pelo processo sol-gel como material de impressão molecular para aplicações analíticas.

A extração em fase sólida (SPE) é, atualmente, a técnica de preparo de amostras biológicas mais comum na análise cromatográfica de fármacos. Esta técnica oferece vantagens sobre a tradicional extração líquido-líquido, entre elas: a alta concentração do analito no extrato final, a maior seletividade, alternativas de escolha de fase sólida, permitindo a extração de praticamente todos os compostos de matrizes aquosas ou orgânicas, o pequeno manuseio da amostra, a ausência de emulsão, o baixo consumo de vidrarias, a facilidade de automação ^{4,11}.

Grande variedade de sorventes são disponíveis comercialmente para uso em SPE, tais como adsorventes (carvão ativado, alumina, sílica gel, entre outros), fases quimicamente ligadas (sílica C8, C18, fenila, etc.) e trocadores iônicos orgânicos e inorgânicos. Fases denominadas de "especiais", mais seletivas, têm sido introduzidas nos últimos anos, como os imunosorventes, fases poliméricas, fases de acesso restrito (RAM) e polímeros de impressão molecular ^{12,13}.

O emprego dos MIS na extração em fase sólida (MISPE) consiste na percolação da amostra em colunas recheadas com os polímeros impressos molecularmente, ou seja, as partículas do polímero são dispostas entre dois discos de retenção nos cartuchos de SPE, onde a espécie de interesse fica retida. As etapas de extração, concentração e isolamento são possíveis em um único passo.

Este trabalho foi desenvolvido objetivando explorar o potencial de seletividade do polímero impresso molecularmente, assim como do desempenho da sílica octadecila, no preparo de amostra por extração em fase sólida, visando a análise de amitriptilina e nortriptilina em plasma por cromatografia líquida de alto desempenho.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e solventes

Foram utilizados os seguintes reagentes para a síntese dos polímeros: 3-aminopropiltrimetoxissilano 95% (APTMS), Acros Organics® e tetraetilortosilicato 95% (TEOS), Acros Organics®. Na extração em SPE, usou-se sistema de suporte e extração em fase sólida *manifold* (PrepSep™); centrífuga NT-811; microcolunas ODS-C18 200 mg/3mL (AccuBOND II®); agitador tipo vórtex - Marconi® MA 162; torpedo contendo nitrogênio White Martins®; banho de água NT-265 Nova Técnica®.

Os solventes e reagentes usados no preparo de soluções, nos testes de otimização das condições cromatográficas e das variáveis do polímero em fase sólida (MISPE) foram: metanol, grau HPLC J. T. Baker®; etanol grau HPLC Nuclear®; acetonitrila, grau HPLC Merck®; isopropanol, grau HPLC, Vetec®; clorofórmio, p.a., Vetec®; ácido acético, p.a., Merck®; acetato de sódio triidratado, p.a., Vetec®; hidróxido de amônio, p.a., Merck®; ácido perclórico p.a., Merck®; éter dietílico p.a., Vetec®, *n*-hexano, p.a., J. T. Baker®, cloreto de sódio, p.a., Merck®, água purificada de Milli-Q, Millipore®.

Soluções-padrão

Foram preparadas soluções-padrão de amitriptilina, nortriptilina e desipramina na concentração de 1,0 mg mL⁻¹ em metanol. A partir de diluições das soluções-padrão, obteve-se concentrações finais para as soluções de trabalho entre 200 e 1000 ng mL⁻¹. Todas as soluções foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e mantidas sob refrigeração (-20 °C), sendo as estoques, no máximo por 30 dias, e as de uso preparadas antes da utilização.

Amostras

Foram utilizadas amostras de plasma, obtidas de sangue heparinizado coletado em sistema de coleta a vácuo, Vacutainer®. O plasma foi separado através de centrifugação a 560 g durante 5 minutos e armazenado à temperatura de -20 °C. Para estudos de otimização e validação analítica, utilizou-se *pool* de plasma branco, coletado de voluntários que não ingeriam qualquer tipo de medicamento e não-fumantes, fortificado com padrões dos analitos. Amostra de plasma de 2 (dois) pacientes que faziam uso de AMI foram analisadas pela técnica convencional de SPE octadecila. O protocolo da pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição onde foi realizado o trabalho - Unifal-MG.

Condições cromatográficas

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) Shimadzu® LC 10 AVP®, bomba LC 10AD, com forno de colunas, injetor automático, detector UV. As condições previamente otimizadas foram: coluna Lichrospher® 60 RP – Select B, Merck (250 mm x 4 mm x 5 µm), e pré-coluna similar LiChroCART® 4-4, Merck, e a fase móvel tampão ácido acético/acetato de sódio 0,25 M pH 5,5: acetonitrila (55:45), na vazão de 0,8 mL min⁻¹. A leitura foi efetuada na região do ultravioleta em 254 nm. Nestas condições, a conformidade do sistema (system suitability) foi satisfatória para os parâmetros avaliados (pratos teóricos, resolução, assimetria dos picos e fator de capacidade) de acordo com os valores preconizados pela US FDA ¹⁴.

Preparação dos polímeros de impressão molecular

Foram sintetizados 2 diferentes polímeros usando o APTMS como monômero e a AMI e a NOR como moléculas molde. Na síntese foi empregado o processo sol-gel, descrito por Silva & Augusto ¹⁰ em 2006. Foram dissolvidas 100 mg do padrão de AMI em 0,8 mL de água; em um frasco de vidro, foram colocadas 0,52 g de APTMS, 2,0 g de TEOS, a solução saturada de padrão de AMI e 0,8 g de hidróxido de amônio, adicionados nesta seqüência. O frasco foi levado ao ultra-som por 2 minutos e posteriormente colocado em estufa a 85 °C por 10 h para a completa secagem e solidificação do material. Após a polimerização, o conteúdo sólido do frasco foi triturado em gral e o pó peneirado em tamis para seleção das partículas com tamanho menor de 100 µm. Este mesmo processo também foi o utilizado para a síntese do polímero com a nortriptilina como molécula molde. O polímero sem a impressão molecular (NIS) foi sintetizado de maneira idêntica, exceto pela ausência do molde no meio reacional. Inicialmente foi sintetizado e avaliado o MIS-AMI e, posteriormente, frente a resultados não satisfatórios, o MIS-NOR.

A dessorção da molécula molde foi realizada em Soxhlet e usando metanol:ácido acético (9:1) como solvente extrator. Decorrido o tempo, cerca de 72 h, o material foi seco em estufa para posterior preparação dos cartuchos de polipropileno para a SPE. Antes do uso o cartucho contendo o polímero foi ainda lavado com porções de cerca de 10 x 10 mL metanol:ácido acético (9:1). O monitoramento da presença do molde foi feito no HPLC.

A caracterização química dos polímeros MIS foi feita por espectrofotometria no infravermelho e a caracterização morfológica obtida por microscopia de varredura eletrônica.

Otimização da extração em fase sólida

A otimização das etapas da MISPE: condicionamento, carregamento, lavagem e eluição foi estudada em cartuchos com 200 mg do polímero e usando-se soluções padrão dos analitos a 400 ng mL⁻¹ em água, para o MIS-AMI e MIS-NOR. Para a extração em SPE C18 foram utilizados cartuchos de 200 mg do sorvente.

Seletividade dos polímeros

Os fatores de impressão (FI) para a AMI e a NOR foram avaliados pela extração de solução de igual concentração dos analitos em cartuchos de MIS e em cartucho contendo polímero não impresso (NIS). Testou-se também a seletividade para outros antidepressivos do grupo dos tricíclicos, como a clomipramina, imipramina e desipramina.

Extração em fase sólida octadecila

Para estas análises, a técnica de extração otimizada é descrita a seguir: condicionar o cartucho com 6,0 mL de metanol, 6,0 mL de acetonitrila e 6,0 mL de água; passar a amostra de plasma diluída (1,0 mL de plasma, 1,0 mL de solução de bicarbonato de sódio 1,0 M pH 10,0 e 2,0 mL de água Milli-Q); lavar o cartucho com 1,0 mL da solução de água/acetonitrila (8:2) e 1,0 mL da solução água/acetonitrila/metanol (2:3:3). Secar a coluna por 2 minutos; eluir os analitos com 4,0 mL de metanol/acetonitrila (8:2). A vazão usada foi ≤ 2 mL min⁻¹. O eluato recolhido em um béquer afunilado foi evaporado sob fluxo de nitrogênio a uma temperatura de 40 °C em banho de água. O resíduo foi ressuspenso em 100 μ L de fase móvel e 40 μ L foram injetados no cromatógrafo nas condições otimizadas. A desipramina na concentração de 200 ng mL⁻¹ foi usada como padrão interno.

Validação do método

Para o método usando a SPE C18, os seguintes parâmetros de validação foram estabelecidos: linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), precisão e recuperação para a análise da AMI e da NOR, avaliados segundo as normas preconizadas pela ANVISA, métodos bioanalíticos¹⁵.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Síntese e caracterização dos polímeros

O rendimento aproximado da síntese dos polímeros usando a AMI e a NOR como moléculas molde foi de 1200 mg. O APTMS possibilita a formação de ligações de hidrogênio entre os átomos de hidrogênio ligados ao grupo amina primária terminal da cadeia lateral (CH₂)_nNH₂ do polímero e átomos de nitrogênio presentes na cadeia lateral dos analitos, nos casos da amitriptilina e nortriptilina. Os trialcóxidos silanos, como o APTMS, são frequentemente usados como modificadores de rede, por fornecerem propriedades específicas, como hidrofobicidade, reatividade e flexibilidade à matriz inorgânica¹⁶. Neste estudo, o APTMS foi hidrolisado e condensado com um precursor siliconado, TEOS, na proporção 1:4.

De acordo com Cummins *et al.*¹⁷ a típica preparação sol-gel consiste em dois estágios. Primeiramente a hidrólise dos monômeros na ausência da molécula molde, seguido pelo passo da condensação na presença da molécula molde. Neste estudo, que partiu de dois precursores - APTMS e TEOS - de cadeias relativamente pequenas, foi feita a adição simultânea dos reagentes e da molécula molde, em uma só etapa. O processo sol-gel foi usado sob condições básicas, o que implica na formação de materiais mais porosos¹⁶.

A dessorção da molécula molde foi realizada em Soxhlet, usando-se o metanol:ácido acético (9:1) como extrator, em um tempo total de 72 h. Os resultados do monitoramento do extrato no HPLC indicaram a eficácia do processo para a remoção dos moldes o que tornou viável o uso dos MIS para os experimentos em SPE.

A Figura 2 mostra o espectro de absorção IV dos ormosils impresso e não-impresso. Pelo espectro de infravermelho pode-se perceber que

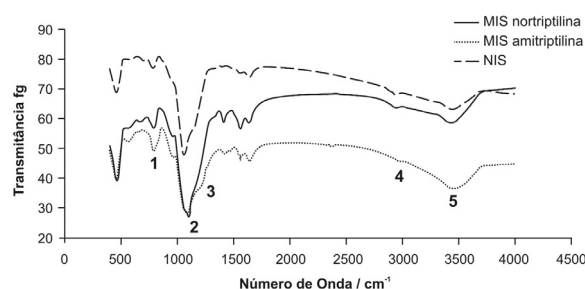


Figura 2. Espectro de absorção infravermelho (KBr) do MIS e NIS. Bandas de absorção: (1) 810 cm⁻¹ (metil C-H), (2) 1107 cm⁻¹ (Si-O), (3) 1273 cm⁻¹ (N-C), (4) 2969 cm⁻¹ (metil C-H) e (5) 3428 cm⁻¹ (-OH).

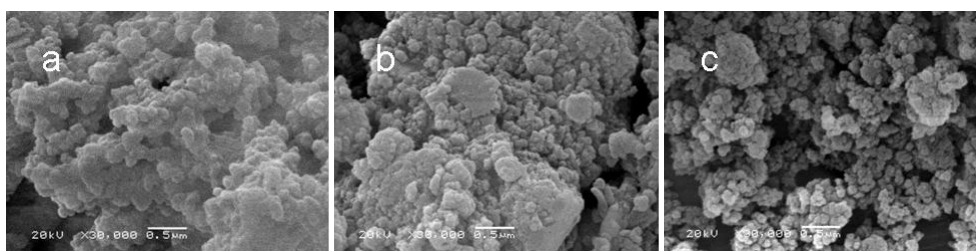


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura da MIS-AMI (a), MIS-NOR (b) e NIS (c). Aumento de 30.000 vezes.

não há diferença significativa entre os dois polímeros, pois foram sintetizados com os mesmos reagentes, exceto pela ausência da molécula molde no polímero de controle. Pode-se observar, porém, que a banda de absorção 1273 cm^{-1} (3) é mais intensa para os polímeros impressos, uma vez que a análise espectrofotométrica do MIS foi feita antes da remoção do molde. A banda 3428 cm^{-1} (5) corresponde ao estiramento axial de grupos -OH resultantes de grupos silanóis não condensados e de água residual. Como apontado por Silva e Augusto¹⁰ a similaridade dos dados espectrais apontam que a presença de molécula molde durante as etapas de hidrólise e condensação não alteram a composição química do ormosil, compatível com a natureza do processo não-covalente sol-gel.

Na microscopia de varredura eletrônica os polímeros apareceram como agregados de partículas irregulares (Fig. 3). Estas irregularidades são causadas pela trituração dos materiais, necessária para pulverizar o monólito obtido na síntese. No uso de polímeros em SPE, a irregularidade das partículas não tem sido apontada como um problema, ao contrário de quando sua finalidade é o empacotamento de colunas cromatográficas, que seria causador de picos largos e assimétricos^{17,18}. As partículas do NIS são menores com relação às do MIS, provavelmente devido a diferenças na velocidade de reações no início da síntese: não usando a solução satu-

rada do analito mas apenas água, a condensação do reticulócito da sílica cresceria mais rapidamente ao redor do núcleo de condensação inicial suspenso na fase sol para o NIS.

Otimização da extração em fase sólida usando os polímeros (MISPE)

O uso dos polímeros impressos molecularmente na extração em fase sólida requer as mesmas etapas do método tradicional de SPE, ou seja, o condicionamento, carregamento da amostra, lavagem e eluição dos analitos¹⁸.

A Tabela 1 sintetiza os experimentos com a MISPE para os polímeros MIS-AMI e MIS-NOR, mostrando os solventes e condições testadas e as selecionadas como as melhores.

O condicionamento do polímero é necessário, pois a exposição do MIP seco aos solventes polares provoca aumento substancial de seu volume. Este efeito provavelmente é devido à solvatação de grupos funcionais insaturados, localizados nas cavidades seletivas do material. A expansão prévia do polímero contribui para tornar a estrutura menos compactada, com poros maiores e mais acessíveis que aumentam a capacidade de carregamento do material¹⁹.

Nos polímeros de ormosil esta etapa foi realizada com 2 mL de metanol seguidos de 2 mL de água. O metanol foi o solvente que menos removeu o analito do polímero, provavelmente pelo efeito da repulsão hidrofóbica que favore-

Etapas da MISPE	MIS-AMI	MIS-NOR
condicionamento	2 mL de metanol + 2 mL de água	2 mL de metanol + 2 mL de água
carregamento	amostra aquosas, pH 3,0 -7,0- 12,0 plasma tratado com acetonitrila e ácido perclórico 6%	amostra aquosas, pH 3,0 -7,0- 12,0 plasma tratado com acetonitrila e ácido perclórico 6%
limpeza	2 mL de água	5 mL de água
eluição	metanol, metanol:ácido acético (9:1), etanol (10 mL) acetonitrila, clorofórmio, isopropanol	metanol, metanol:ácido acético 9:1 (5 mL) , etanol, acetonitrila, diclorometano

Tabela 1. Solventes e condições avaliadas e as selecionadas (em negrito) nas diferentes etapas da extração em fase sólida (MISPE) para os polímeros de amitriptilina (MIS-AMI) e nortriptilina (MIS-NOR).

ce a retenção do analito, fato observado por Zhu *et al.*²⁰ Este solvente de condicionamento foi também o utilizado por Silva e Augusto¹⁰, para análise em MIS/CLAE de cafeína de urina.

Para o carregamento das amostras aquosas foi testada a influência do pH, pois considerando-se a estrutura dos analitos e dos sítios de ligação dentro das nanocavidades, provavelmente moléculas que podem ser protonadas e desprotonadas na dependência do pH. Pôde-se observar que usando-se o MIS-AMI, o pH que mais favoreceu a retenção foi o ácido e com o MIS-NOR, o neutro. Talvez no pH 3,0, o nitrogênio do grupo ativo do polímero estando protonado favoreça a interação do N terminal dos analitos de interesse. No pH 7,0, provavelmente é o N dos analitos que estará protonado, favorecendo a interação. O efeito final resultante do pH sobre a eficiência da extração poderá ser resultante de efeitos simples sobre a carga dos analitos e sobre os sítios ativos. Considerando a complexidade envolvida na estimativa de todas as tendências, a otimização do pH deverá ser essencialmente empírica¹⁰.

Amostras de plasma requerem tratamento prévio antes da extração em MISPE, uma vez que a presença de grandes quantidades de proteínas diminui a vida útil do cartucho e pode afetar a retenção dos analitos nas cavidades, além de danificar o sistema cromatográfico. Por outro lado, tanto a AMI quanto a NOR apresentam elevadas taxas de ligação protéica, o que poderia afetar suas retenções nas cavidades-sítio do polímero. Assim, foram testados dois agentes precipitantes de proteínas: o ácido perclórico 6% (proporção de 0,8:1 mL de amostra) e a acetoneitrila (proporção 2:1 de amostra). Após a precipitação, a amostra foi centrifugada e todos os sobrenadantes obtidos foram usados para o carregamento dos cartuchos.

A acetoneitrila foi o agente precipitante que forneceu melhor resposta (em área dos picos) para os analitos, tanto no polímero de MIS-AMI quanto no de MIS-NOR. O sobrenadante desta precipitação (~2,5 mL) foi totalmente usado no carregamento dos cartuchos.

Na etapa de limpeza pretende-se remover do cartucho possíveis interferentes, ligados por interações não-específicas, com mínimo efeito nas interações mais específicas do analito²¹. Também visa promover a dessorção do analito retido por ligações não-específicas²². Nos cartuchos de ormosil, o solvente usado para remoção de interferentes, após o carregamento dos cartu-

chos foi o metanol, no volume de 2 mL para o MIS-AMI e de 5 mL para o MIS-NOR.

Baseando-se na afinidade preferencial do analito pelo solvente em relação aos sítios de ligação do polímero, otimizou-se o solvente e o volume de eluição que forneceu o maior sinal analítico. Para que ocorra eluição, o solvente deve apresentar afinidade pelo analito maior de que a fase sólida.

Para a eluição dos analitos do MIS-AMI, o etanol, solvente polar, foi o que forneceu a melhor resposta, provavelmente contribuindo para que o nitrogênio terminal da AMI e o nitrogênio do monômero não ficassem polarizados, diminuindo assim a interação por cargas que se daria entre a molécula molde e o monômero MIS-AMI e facilitando a eluição. Para o MIS-NOR, o metanol acidificado demonstrou melhores condições na eluição dos analitos, provavelmente por polarizar o nitrogênio da cadeia lateral dos analitos e o nitrogênio do monômero, estabelecendo cargas contrárias, gerando uma repulsão e favorecendo a eluição.

Seletividade dos polímeros

A seletividade dos polímeros impressos foi avaliada para os analitos AMI e NOR, como também para outros antidepressivos do grupo dos tricíclicos com estruturas semelhantes, a clomipramina e imipramina para o MIS-AMI e, além desses, também para a desipramina para o MIS-NOR.

A Tabela 2 mostra os fatores de impressão para os compostos testados nos dois polímeros. Com base nestes resultados pode-se inferir seletividade de baixa a moderada aos polímeros impressos molecularmente. Provavelmente ocorrem também ligações inespecíficas dos fármacos na matriz polimérica, uma vez que as diferenças entre retenção nos MIS e NIS não foram grandes.

Fármaco	MIS-AMI	MIS-NOR
Amitriptilina	2,5	1,7
Nortriptilina	2,6	3,5
Clomipramina	1,3	7,4
Imipramina	1,1	2,5
Desipramina	-	2,5

Tabela 2. Fatores de impressão (razão da resposta MIS versus NIS) dos fármacos antidepressivos tricíclicos nos dois polímeros testados (MIS-AMI e MIS-NOR).

A diferença química estrutural predominante entre os compostos da classe dos ADT é a presença de um heterociclo central nas moléculas de CLOMI, DESI e IMI, sendo para as moléculas de AMI e NOR a presença de cadeia lateral insaturada. Pode-se destacar ainda a presença de grupo amina terminal terciário para AMI, CLOMI e IMI, sendo grupo amina terminal secundário para NOR e DESI. Os átomos de nitrogênio presentes no heterociclo e na cadeia lateral são relevantes na interação fármaco-polímero, por meio de ligação de hidrogênio. Ao restante da molécula predominam-se interações dipolo induzido.

Extração em SPE octadecila

Parâmetros de validação

Para o estudo de linearidade, amostras de pool de plasma branco foram fortificadas com quantidades conhecidas de amitriptilina, nortriptilina e padrão interno. A regressão linear simples, descrita pela equação $y = ax + b$, foi calculada através do quociente das áreas dos picos de AMI e NOR pela área do padrão interno, a desipramina (DESI) pelo método dos mínimos quadrados. O método mostrou linearidade de 20 a 400 ng mL⁻¹ para a AMI e NOR, sendo as equações da reta e coeficientes de correlação respectivamente para a AMI: $y = 0,0042x + 0,0272$ ($r = 0,9960$) e para a NOR: $y = 0,0048x - 0,053$ ($r = 0,9964$). O coeficiente de correlação está dentro do valor preconizado pela ANVISA¹⁵, de igual ou superior a 0,98 em bioanálises. Pode-se observar, pelo coeficiente angular, que a sensibilidade do método para os dois analitos é semelhante. Esta faixa dinâmica é satisfatória para determinação dos analitos desde o limite inferior até o superior do intervalo terapêutico, que para a NOR é entre 46 e 236 ng mL⁻¹²³, e para a AMI, de 80 a 200 ng mL⁻¹²⁴, assim como em estudos de biodisponibilidade do fármaco.

A precisão foi determinada pela análise de quintuplicatas de amostras de plasma fortificadas nas concentrações de 20, 50 e 300 ng mL⁻¹. A precisão intra-ensaio mostrou CV entre 3,2 e 16,4 % (AMI) e de 9,5 a 14,8% (NOR) e a precisão intermediária (3 dias consecutivos, triplicata por dia) CV entre 3,1 e 19,2% (AMI) e 9,7 e 17,5% (NOR), sendo os valores mais altos obtidos na concentração mais baixa (Tabela 3). Os valores obtidos podem ser considerados satisfatórios, ou seja, % CV menores do que 20% no LQ e abaixo de 15% nas demais concentrações¹⁵.

Concentração (ng mL ⁻¹)	% CV intra-ensaio		% CV interensaio	
	AMI	NOR	AMI	NOR
20	16,4	14,8	19,2	17,5
50	3,2	9,5	3,1	9,7
300	6,5	10,0	8,6	12,6

Tabela 3. Precisão intra-ensaios e interensaio para a análise de amitriptilina (AMI) e nortriptilina (NOR) por SPE C18 e CLAE.

Concentração (ng/mL ⁻¹)	Recuperação (%)	
	AMI	NOR
20	98,2	89,5
50	96,1	97,8
300	103,2	94,3
média	99,1	93,8

Tabela 4. Recuperação (%) do método de análise de amitriptilina (AMI) e nortriptilina (NOR) por SPE C18.

A recuperação relativa foi calculada pela relação das respostas obtidas com amostras de plasma branco fortificadas com os analitos e o PI e extraídas com as resultantes de amostras de plasma branco, extraídas e fortificadas ao final de cada processo, ou seja, nos eluatos provenientes da SPE. Foram analisadas as mesmas concentrações dos estudos de precisão, em triplicata/concentração. A recuperação média foi de 99,1% para a AMI e de 93,8% para a NOR (Tabela 4).

Os limites de detecção e de quantificação foram definidos pela relação sinal/ruído de 3 (LD) e de 10 (LQ) com relação ao perfil de amostras brancas, e determinados através da adição de amitriptilina e nortriptilina em amostras de pool de plasma branco, sendo analisadas 5 replicatas por concentração. Os limites de detecção foram respectivamente de 7,3 ng mL⁻¹ para a AMI e de 6,9 ng mL⁻¹ para a NOR; o limite de quantificação foi estabelecido em 20 ng mL⁻¹ para ambos analitos.

A maior parte de estudos envolvendo a análise de antidepressivos tricíclicos utiliza a LLE no preparo de amostras. Porém, alguns autores descrevem o uso de extração em fase sólida, ainda que não voltada para a análise simultânea da AMI e de seu metabólito ativo, a NOR. Jansinska & Starczewska (2003)²⁵ aplicaram a técnica para extração de AMI em SPE C18 e da IMI e clorprotixina em SPE cicloexila em amostras

de plasma, seguida de detecção espectrofotométrica, com recuperação entre 96 a 103%. Samandou *et al.*²⁶ usaram a SPE C18 para extração dos ADT: AMI, CLOMI, IMI e doxepina em amostras farmacêuticas e em urina e plasma (após precipitação de proteínas), com recuperações entre 91 e 114% para o plasma..

Na técnica desenvolvida e proposta nesta pesquisa, foi avaliada a necessidade ou não de se usar previamente ao carregamento da amostra no cartucho C18 um agente precipitante de proteínas, no caso a acetonitrila na proporção 2:1. Os resultados mostraram não haver esta necessidade, pelo contrário, houve resposta menor dos analitos após a precipitação, o que pode ser esperado uma vez que sempre há perda parcial dos analitos na precipitação protéica.

O uso dos cartuchos empacotados com octadecila, nas condições otimizadas e validadas descritas, permitiu seu uso na extração de amostras de plasma de dois pacientes em uso de amitriptilina, resultando num valor de 259,3 e de 178,0 ng mL⁻¹, respectivamente para a amitriptilina e nortriptilina para o paciente A. O paciente B mostrou valores de 128,3 e de 117,3 ng mL⁻¹, respectivamente para a amitriptilina e nortriptilina, em amostra coletada antes da ingestão da dose da manhã (concentração vale). Estes resultados denotam que este sorvente permite a sua aplicação em amostras reais de pacientes tratados com o fármaco.

Testes de repetitividade com os polímeros

Uma vez otimizadas as condições para uso do MISPE, foram realizados experimentos para avaliar a repetitividade do método, antes de se fazer a validação do mesmo. Após várias tentativas, usando o mesmo cartucho para 6 replicatas, com lavagem do mesmo entre cada percolação de amostra, e também utilizando um cartucho novo para cada replicata com polímero proveniente da mesma síntese, não se conseguiu resultados precisos, e CV tão elevados quanto 84,3% para a NOR e 100,5% para a AMI foram observados, o que impossibilitou a continuidade dos estudos com os polímeros.

Talvez a baixa precisão seja ocasionada, em parte, por variações na disposição das cavidades seletivas expostas para ligação do analito, especialmente considerando a pulverização manual do monólito que gera partículas irregulares. A variação dos resultados a cada teste comprometeu a repetitividade dos resultados destes materiais para aplicação no preparo de amostras. Foi

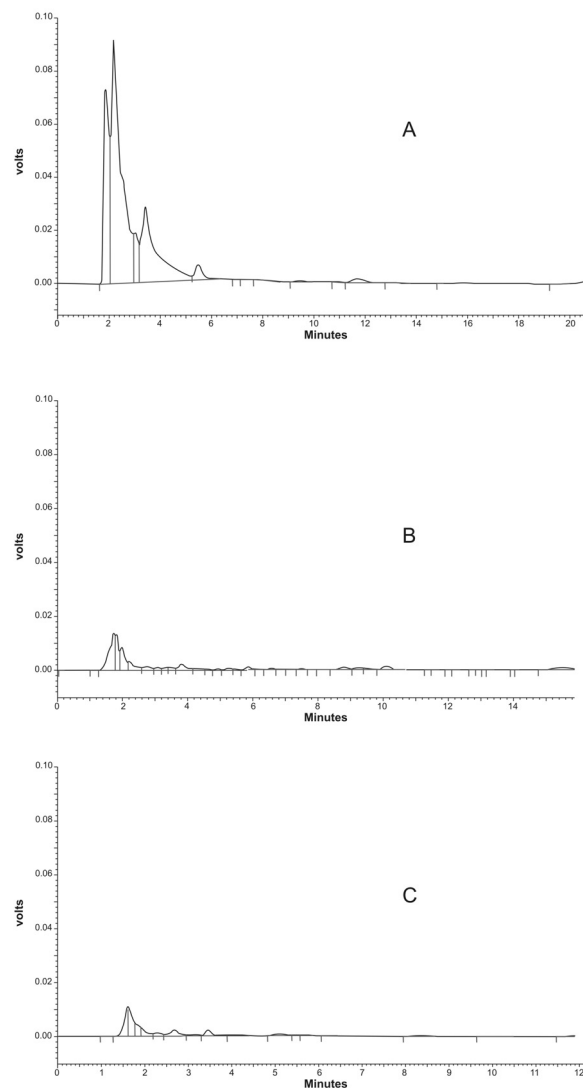


Figura 4. Cromatogramas de amostra de plasma branco extraída por C18 (a), MIS-AMI (b) e MIS-NOR (c).

ainda feita tentativa de gerar curva analítica para este polímero, porém, sem sucesso, com valores de áreas de pico às vezes maiores para concentrações mais baixas. Somado a este fator comprometedor, vale destacar que a vida útil dos cartuchos de MIS, quando aplicados em amostras reais, após precipitação protéica, foi muito baixa, em torno de duas extrações. Para amostras teste, aquosas, os cartuchos foram usados em torno de oito vezes. O pequeno número de extrações foi decorrente da resposta mais variável do polímero com o aumento do uso, como também da obstrução da fase sólida à passagem dos solventes, muitas vezes observada em cartuchos novos. Silva & Augusto¹⁰ relataram o uso do cartucho em até vinte extrações em amostras

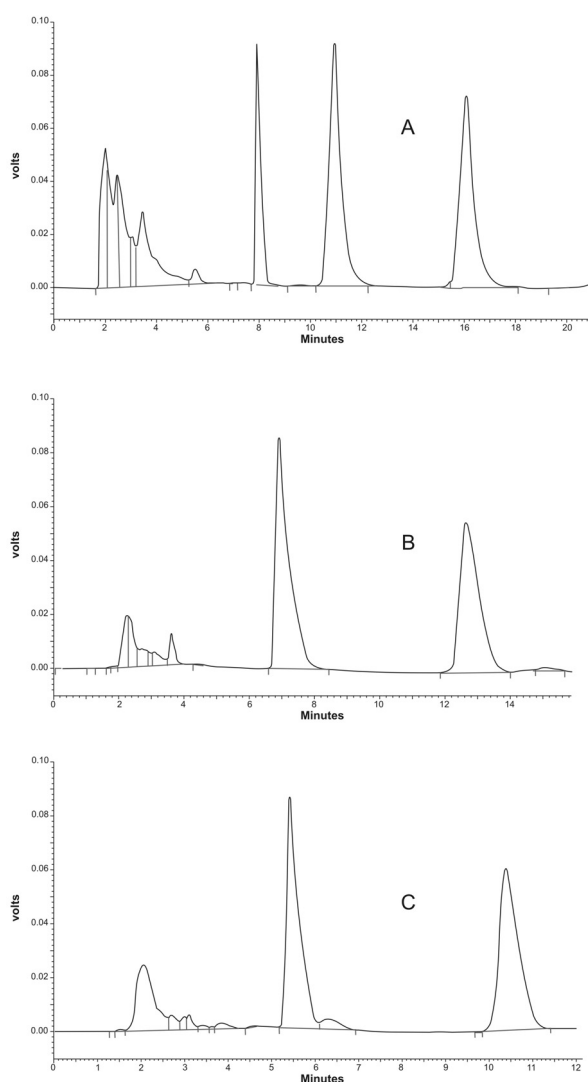


Figura 5. Cromatograma de amostra de plasma fortificado com 400 ng mL^{-1} de DESI, NOR e AMI extraída por C18 (a) e cromatogramas de amostra de plasma fortificado com 400 ng mL^{-1} de NOR e AMI extraída por MIS-AMI (b) e MIS-NOR (c).

de urina para análise de cafeína.

Perfil cromatográfico

A Figura 4 mostra cromatogramas de um pool de plasma branco, extraído por C18, MIS-AMI e MIS-NOR. A Figura 5 mostra cromatogramas para amostras fortificadas com os analitos e extraídas, respectivamente, pelo SPE C18, MIS-AMI e MIS-NOR. Pode-se verificar que o perfil dos brancos de amostra extraídos no MISPE está mais limpo de que os extraídos pelo SPE octadecila. Para amostras líquidas, os MIP têm sido frequentemente comparados com sorventes clássicos a fim de demonstrar a possibilidade de obtenção de uma linha de base mais limpa quando se usa MIP do que quando se usa sílicas

C-18 ou polímeros hidrofóbicos ⁸.

CONCLUSÕES

O uso de polímero de impressão molecular, obtido por processo sol-gel usando o aminopropiltrimetoxisilano como monômero e a AMI ou a NOR como moléculas molde, resultou em material que não mostrou repetitividade adequada para uso na análise cromatográfica da AMI e NOR. Porém, a dessorção do molde foi possível neste tipo de polímero e os cromatogramas resultantes da extração de amostras de plasma mostraram-se mais limpos e livres de interferentes de outros constituintes da amostra que pudessem comprometer a identificação dos analitos. O sorvente sílica octadecila em SPE demonstrou condições adequadas para uso na análise cromatográfica de AMI e NOR em plasma, denotando simplicidade, linearidade, repetibilidade e recuperação que permitem seu uso para fins de monitorização terapêutica ou estudos de biodisponibilidade com estes fármacos.

Agradecimentos. Os autores agradecem ao Instituto de Química da Unicamp, através dos professores Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda e Fábio Augusto e aos doutorandos Eduardo Costa de Figueiredo e Raquel Gomes da Costa Silva pela disponibilidade dos laboratórios e materiais necessários às sínteses dos polímeros e às suas identificações.

REFERÊNCIAS

- Steimer, W., B. Muller, S. Leucht & W. Kissling (2001) *Clin. Chem.* **308**: 33-41.
- Torre, B.R., J. Dreher, I. Malevany, M. Bagli, M. Kolbinger, H. Omran, B. Luderitz, B. & M.L. Rao (2001) *Ther. Drug Monit.* **23**: 435-40.
- Leke, R.; L.V.C. Portela, D.O. Souza, D.R. Lara & F.V. Thiesen (2004) *Rev. Bras. Toxicol.* **17**: 51-9.
- Kataoka, H. (2003) *Trends Anal. Chem.* **22**: 232-44.
- Haupt, K. (2001) *Analyst* **126**: 747-56.
- Lavignac, N., C.J. Allender & K.R. Brain (2004) *Anal. Chim. Acta* **510**: 139-45.
- Tarley, C.R.T., M.D.P.T. Sotomayor & T. Kubota (2005) *Quim. Nova* **28**: 1076-86.
- Pichon, V. (2007) *J. Chromatogr. A* **1152**: 41-53.
- Brinker, J. & G. Scherer (1989) *"Sol-gel Science"*, Academic Press, New York, 1989, pp. 48-61.
- Silva, R.G.C. & F. Augusto (2006) *J. Chromatogr. A* **1114**: 216-23.
- Poole, C.F. (2002) *"Principles and practice of solid-phase extraction"*, in *"Sampling and sample preparation for field and laboratory: Fun-*

- damentals and New Directions in Sample Preparation*" (J. Pawliszyn, ed). 2a ed. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 341-87.
12. Oliveira, A. M., A.F.P. Biajoli, C.H.V. Fidélis, R.G.C. Silva & F. Augusto (2007) "Extraction and pré-concentration techniques for chromatographic analysis" in "Trends in sample preparation" (M.A.Z. Arruda ed.) Science Pub., New York, pp. 136-64.
 13. Queiroz, S.C.N., C.H. Collins & I. Jardim (2001) *Quím. Nova* **24**: 68-76.
 14. United States Food and Drug Administration (1994) "Guidance for industry. Reviewer guidance validation of chromatographic methods", FDA Centre for drug evaluation and research, Rockville.
 15. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil. Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003. "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Visalegis. <Disponível em: <http://anvisa.gov.br>.> [Acesso em: 10 out.2008].
 16. Collinson, M.M. (1998) *Mikrochim. Acta* **129**: 149-65.
 17. Cummins, W., P.P. Duggan & P. Mcloughlin (2005) *Anal. Chim. Acta* **542**: 52-60.
 18. Qiao, F.H., H.Y. Sun & K.H.Row (2006) *Chromatographia* **6**: 443-8.
 19. Maier, N.N.G., S. Buttinger, E. Welhartizki & W. Lindner (2004) *J. Chromatogr. B* **804**: 103-11.
 20. Zhu, X., J. Yang, Q. Su, J. Cai & Y. Gao (2005) *J. Chromatogr. A* **1092**: 161-9.
 21. He, C., Y. Long, J. Pan, K. Li & J. Liu (2007) *Biochem. Biophys. Methods* **70**: 133-50.
 22. Baggiani, C., P., Baravelle, G., Giraudi, M. & C. Tozzi (2007) *J. Chromatogr. A* **1141**: 158-64.
 23. Ribeiro, M.G., E.L.A. Pereira, R. Santos-Jesus, E.P. Sena, K. Kátia Petribú & I. R. Oliveira (2000) *Rev. Bras. Psiquiatr.* **22**: 51-6.
 24. Linden, R., M.V. Antunes, A.L. Ziukoski, M. Wingert, P. Tonello, M. Tzvetkov & A.A. Souto (2008) *J. Braz. Chem. Soc.* **19**: 35-41.
 25. Jasinska, A. & B. Starczewska (2003) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **31**: 795-9.
 26. Samanidou, V.F., M.K. Nika & I.N. Papadoyannis (2007) *J. Sep. Sci.* **30**: 2391-400.