

NATALIA MEINL SCHMIEDT SATTOLO

**Análise de estatinas em plasma humano por cromatografia gasosa acoplada
à espectrometria de massas utilizando SPME e derivatização *in situ* no
preparo de amostra**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química
de São Carlos, da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Química Analítica
Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

São Carlos

2011

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob a exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, 18/05/2011

Natalia Meinel Schmiedt Sattolo

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

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Nivaldo e Maria Sueli e meu irmão
Thales, pelo amor, apoio, incentivo e pela
grandiosa formação que dedicaram a mim.*

AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças pela oportunidade e orientação para realização deste trabalho.

Ao colega Paulo Clairmont F.L. Gomes pela colaboração, sugestões e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto pela ajuda na interpretação dos resultados do planejamento experimental realizado.

Ao Prof. Dr. Anil Kumar Singh pelo fornecimento dos padrões analíticos utilizados.

A Dra. Regina Amélia Bassa Gonçalves do Laboratório Médico Dr. Maricondi pelas amostras de plasma humano concedidas.

Ao Alexandre Cruz pela amizade e disposição em solucionar os problemas instrumentais que ocorreram durante o trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Cromatografia, agradeço a companhia, momentos de descontração e apoio durante o mestrado.

A Elaine e Odete pela ajuda em me atender.

Às funcionárias da Biblioteca do IQSC e às funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação pela dedicação.

A CAPES, pela bolsa concedida, ao IQSC e à USP pelo apoio institucional.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para que eu pudesse concluir este trabalho.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

A monitorização terapêutica permite a individualização do regime de dosagem, assegurando a eficácia clínica e minimizando os efeitos adversos dos fármacos prescritos. Atualmente, as estatinas têm sido monitoradas, pois, embora eficazes e muito utilizadas, apresentam alguns efeitos adversos não desejáveis. Neste trabalho, as técnicas SPME e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) foram avaliadas para a análise de estatinas (fluvastatina, simvastatina e atorvastatina) em plasma humano para fins de monitorização terapêutica. As condições de extração e derivatização foram otimizadas empregando planejamento experimental e avaliando a influência dos principais parâmetros envolvidos. Para otimização das condições de extração avaliou-se parâmetros como tempo e temperatura de extração, pH, volume de solução tampão e força iônica; e para otimização das condições de derivatização avaliou-se parâmetros como volume de reagente derivatizante, volume de agente pareador iônico e pH. A extração foi realizada utilizando fibras de PDMS-DVB, e a dessorção feita termicamente no injetor do cromatógrafo a gás. O método desenvolvido foi validado segundo normas da ANVISA, apresentando linearidade na faixa de 20 a 500 ng mL⁻¹, precisão com coeficientes de variação menor que 14% e recuperação relativa de 20 a 40%. Concluída a validação analítica, a metodologia proposta foi aplicada em amostras reais de plasma de pacientes em terapia com simvastatina concedidas pelo Laboratório Médico Dr. Maricondi e pela Casa de Saúde de São Carlos.

ABSTRACT

Therapeutic drug monitoring allows individualization of dosage regimen, ensuring the clinical efficacy and minimizing the adverse effects of prescribed drugs. Currently, statins have been monitored; despite they are effective, some statins have undesirable adverse effects. In this work, SPME technique and gas chromatography / mass spectrometry (GC-MS) were evaluated for analysis of statins (fluvastatin, simvastatin and atorvastatin) in human plasma for therapeutic drug monitoring. The extraction and derivatization conditions were optimized using experimental design and evaluating the influence of the main parameters involved in the SPME procedure. To optimize the extraction conditions were evaluated parameters such as time and extraction temperature, pH, volume of buffer and ionic strength, and to optimize the derivatization conditions were evaluated parameters as derivatization reagent volume, ionic agent pareador volume and pH. The extraction was performed using PDMS-DVB fibers, and thermal desorption performed in the injector of the gas chromatograph. The method was validated according to ANVISA, showing linearity in the range 20 to 500 ng mL⁻¹, the precision with coefficients of variation less than 14% and relative recovery from 20 to 40%. The proposed methodology was applied to real samples of plasma from patients on therapy with simvastatin provided by the Laboratório Médico Dr. Maricondi and Casa de Saúde of São Carlos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de uma seringa de SPME.....	15
Figura 2 - a) Processo de extração SPME, b) Processo de dessorção térmica SPME-GC, c) processo de dessorção SPME-HPLC.....	17
Figura 3 – Modos de extração em SPME: (a) direta, (b) headspace e (c) com proteção de membrana	19
Figura 4 - Comparação de mecanismos de extração por adsorção e absorção. Diagramas da esquerda ilustram os estágios iniciais dos processos e diagramas da direita ilustram a condição de equilíbrio.....	20
Figura 5 - Aterosclerose: obstrução das artérias pelo acúmulo de lipídeos em suas paredes	29
Figura 6 - Síntese do mevalonato mostrando o local da ação das estatinas que inibem a HMG-CoA redutase, a taxa de limitação da enzima na síntese do colesterol.....	30
Figura 7 - Estrutura química das estatinas.....	30
Figura 8 - Planejamento em estrela para duas variáveis, onde x_1 e x_2 representam os valores das variáveis estudadas.....	38
Figura 9 – Esquema geral da reação de derivatização de ácidos carboxílicos com brometo de tetrabutilamônio e dietil sulfato formando ésteres etílicos.....	46
Figura 10 – Cromatograma de íons totais (TIC) no modo full <i>SCAN</i> e espectro de massas no modo EI da amostra fortificada com 1000 ng.mL^{-1} de fluvastatina usando fibra de CW-DVB para extração SPME com derivatização <i>in situ</i>	59
Figura 11 – Cromatograma de íons totais (TIC) no modo full <i>SCAN</i> e espectro de massas no modo EI da amostra fortificada com 1000 ng.mL^{-1} de simvastatina usando fibra de CW-DVB para extração SPME com derivatização <i>in situ</i>	60
Figura 12 – Cromatograma de íons totais (TIC) no modo full <i>SCAN</i> e espectro de massas no modo EI da amostra fortificada com 1000 ng.mL^{-1} de atorvastatina usando fibra de CW-DVB para extração SPME com derivatização <i>in situ</i>	61
Figura 13 - Comparação entre as áreas dos cromatogramas obtidos por SPME-GC-MS para fluvastatina, simvastatina e atorvastatina em diferentes fases extratoras.....	63
Figura 14 - Diagrama de Pareto do planejamento fatorial fracionado 2^{5-2} representando a extração da fluvastatina.	66
Figura 15 - Diagrama de Pareto do planejamento fatorial fracionado 2^{5-2} representando a extração da atorvastatina.	67

Figura 16 - Diagrama de Pareto do planejamento fatorial fracionado 2^{5-2} para extração da simvastatina.	68
Figura 17 - Diagrama de Pareto do planejamento fatorial completo 2^3 representando a derivatização da fluvastatina.....	69
Figura 18 - Esquema representativo do planejamento composto central com $k = 2$ e $\alpha = 1,414$	70
Figura 19 – Gráfico de superfície de resposta através do planejamento composto central para fluvastatina, simvastatina e atorvastatina.	71
Figura 20 - Curva cinética da extração SPME para as estatinas estudadas.....	72
Figura 21 - Cromatograma obtido no modo SIM do plasma branco de referência utilizando o método SPME-GC-MS.....	74
Figura 22 - Cromatograma obtido no modo SIM da amostra de plasma fortificada com estatinas e ibuprofeno deuterado como padrão interno na concentração de 1000 ng.mL^{-1}	74
Figura 23 - Curva de calibração obtida para a fluvastatina com intervalo de concentração plasmática de 20 a 500 ng.mL^{-1}	75
Figura 24 - Curva de calibração obtida para a simvastatina com intervalo de concentração plasmática de 50 a 500 ng.mL^{-1}	76
Figura 25 - Análise de amostras de plasma de pacientes que administraram doses terapêuticas de simvastatina.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Recentes aplicações da técnica SPME-GC-MS para análise de fármacos em fluidos biológicos.	18
Tabela 2 - Fibras para SPME disponíveis comercialmente: usos, propriedades e aplicações..	23
Tabela 3 - Dados farmacocinéticos de algumas das estatinas.	32
Tabela 4 - Relatos de rabdomiólise associados com estatinas.....	33
Tabela 5 – Métodos analíticos empregados para determinação quantitativa de estatinas.....	34
Tabela 6 – Planejamento fatorial fracionado 2^{5-2} utilizado para otimizar as condições de extração.....	49
Tabela 7 – Planejamento fatorial completo 2^3 utilizado para otimizar as condições de derivatização.....	50
Tabela 8 – Planejamento composto central utilizado para otimizar as condições de extração e derivatização.....	50
Tabela 9 - Valores das concentrações utilizadas na avaliação da linearidade.....	53
Tabela 10 - Valores de concentração usados para avaliação da precisão intra e inter-dia.....	54
Tabela 11 - Valores de concentração usados para avaliação da recuperação.....	56
Tabela 12 - Coeficientes de partição octanol-água ($\log K_{o/w}$), constante de acidez (pKa), íons selecionados (m/z) e respectivos tempos de retenção (t_R) de cada analito.....	65
Tabela 13 - Resultados da linearidade para os fármacos estudados.....	75
Tabela 14 - Dados obtidos da precisão intra-dia para os fármacos estudados.....	76
Tabela 15 - Dados obtidos da precisão inter-dia para os fármacos estudados.....	77
Tabela 16 - Dados obtidos de Limites de Quantificação (LOQ) e Detecção (LOD) para os fármacos estudados.....	77
Tabela 17 - Dados obtidos da recuperação relativa para as estatinas estudadas.....	78
Tabela 18 - Concentração plasmática determinada para amostras de plasma de pacientes em terapia com simvastatina.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASE – Extração acelerada com solvente

ATOR – Atorvastatina

CCD – Planejamento composto central

CW/DVB – Carbowax divinilbenzeno

CW/TR – *Carbowax templated resin*

CXEN/PDMS – Carboxeno divinilbenzeno

DAC – Doença arterial coronariana

DES – Dietil sulfato

DI – Extração direta

DMS – Dimetil sulfato

DPR – Desvio padrão relativo

FLU – Fluvastatina

GC – Cromatografia gasosa

HMG-CoA – Hidroximetilglutaril coenzima A

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

HS – *Headspace*

IBU – Ibuprofeno

$K_{o/w}$ – Coeficiente de distribuição octanol/água

LC – Cromatografia líquida

LLE – Extração líquido-líquido

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

LPME – Microextração em fase líquida

MEPS – Microextração por solvente empacotado

MS – Espectrômetro de massas

PA – Poliacrilato

PDMS – Polidimetilsiloxano

PDMS/DVB – Polidimetilsiloxano divinilbenzeno

SBSE – Extração por sorção em barra de agitação

SFE – Extração com fluido super crítico

SIM – Simvastatina

SPDE – Extração dinâmica em fase sólida

SPE – Extração em fase sólida

SPME – Microextração em fase sólida

TBA-Br – Brometo de tetrabutylamônio

TBA-HSO₄ – Tetrabutylamônio hidrogeno sulfato

TIC – Cromatograma de íons totais

UV – Detector de ultra violeta

VOCs – Compostos orgânicos voláteis

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 PREPARO DE AMOSTRAS.....	13
1.2 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME).....	15
1.2.1 Modos de extração.....	19
1.2.2 Mecanismos de extração.....	20
1.2.3 Parâmetros experimentais que afetam a eficiência da extração	22
1.2.3.1 Fase extratora.....	22
1.2.3.2 Força Iônica	23
1.2.3.3 Efeito do pH	24
1.2.3.4 Tempo de extração.....	24
1.2.3.5 Efeito da temperatura.....	25
1.2.3.6 Agitação da amostra	25
1.2.3.7 Proteínas do plasma.....	26
1.2.3.8 Dessorção dos analitos	26
1.3 ANÁLISE DE FÁRMACOS EM FLUIDOS BIOLÓGICOS.....	27
1.4 ESTATINAS	28
1.4.1 Estatinas no tratamento da hiperlipidemia	28
1.4.2 Absorção, metabolismo e excreção	31
1.4.3 Uso terapêutico e efeitos adversos.....	32
1.4.4 Métodos analíticos para determinação quantitativa de estatinas	33
1.5 DERIVATIZAÇÃO	34
1.6 PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS	35
1.6.1 Planejamento fatorial completo.....	36
1.6.2 Planejamento fatorial fracionário	36
1.6.3 Planejamento composto central.....	37
2. OBJETIVOS.....	40
2.1 OBJETIVOS GERAIS	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
2.3 RELEVÂNCIA DO TRABALHO	41

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1 REAGENTES E PADRÕES	43
3.2 AMOSTRAS ANALISADAS.....	43
3.3 MATERIAIS	44
3.4 INSTRUMENTAÇÃO	44
3.5 MÉTODOS.....	45
3.5.1 Preparo dos padrões analíticos	45
3.5.2 Preparo das amostras em plasma.....	45
3.5.3 Derivatização das estatinas.....	46
3.5.4 Condições cromatográficas.....	47
3.5.5 Procedimento de extração para amostras de plasma	47
3.5.6 Otimização das condições de extração por SPME	48
3.5.7 Validação	51
3.5.7.1 Seletividade	52
3.5.7.2 Linearidade	52
3.5.7.3 Precisão.....	53
3.5.7.4 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)	54
3.5.7.5 Recuperação.....	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1 Extração, separação e identificação das estatinas utilizando SPME-GC-MS	58
4.2 Seleção da fase extratora da fibra de SPME.....	62
4.3 Desenvolvimento da metodologia SPME-GC-MS.....	63
4.4 Otimização das condições de extração por SPME	65
4.4.1 Planejamento fatorial fracionado (2^{5-2}).....	65
4.4.2 Planejamento fatorial completo (2^3).....	68
4.4.3 Planejamento Composto Central (CCD)	70
4.4.4 Otimização univariada.....	72
4.5 Validação	73
4.5.1 Seletividade	73
4.5.2 Linearidade	75
4.5.3 Precisão.....	76
4.5.4 LOQ e LOD	77
4.5.5 Recuperação.....	78
4.5.6 Aplicação em amostras reais de plasma	79
5. CONCLUSÃO.....	82

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 PREPARO DE AMOSTRAS

As áreas que apresentam interesse na análise de compostos em fluidos biológicos são muitas, dentre elas a farmacêutica, análises clínicas, forense, e outras. A análise cromatográfica de substâncias presentes nestes tipos de matrizes, como soro, plasma ou urina, em geral, requer um pré-tratamento da amostra. As razões para tal são inúmeras, destacando a complexidade dessas matrizes biológicas, das quais os compostos são obtidos, a existência de proteínas que são incompatíveis com as colunas cromatográficas, e a concentração em nível de traços das substâncias a serem analisadas (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

As técnicas de extração e/ou pré-concentração permitem que a análise dos compostos de interesse se torne possível. O objetivo principal é a obtenção de uma fração da amostra original enriquecida com as substâncias de interesse, de forma que se obtenha uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e tempo razoável de análise (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Um levantamento realizado por Majors, envolvendo um grande número de técnicas analíticas, demonstrou que cerca de 60% do tempo total de análise é gasto no preparo de amostra, enquanto que apenas cerca de 6% do tempo é consumido para a determinação dos seus constituintes. Além de ser a etapa mais demorada do processo de análise de uma amostra, o seu preparo também é a etapa mais susceptível à introdução de erros (MAJORS, 1991, 1995).

Os métodos convencionais mais empregados em análises de rotina no tratamento de amostras biológicas têm sido a extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida

(SPE). A técnica de extração líquido-líquido (LLE) apresenta diversas desvantagens, tais como, alto consumo de solventes orgânicos, exposição do analista a compostos tóxicos, várias etapas para execução e formação de emulsão entre as fases, resultando em perda do analito. Já a extração em fase sólida (SPE) apresenta uma grande variedade de fases extratoras, resultando em diferentes tipos de interações com os analitos favorecendo, desta forma, a seletividade analítica; possibilita a automação das análises e o acoplamento em linha com técnicas cromatográficas. Entretanto, esta técnica tem apresentado algumas limitações como o bloqueio dos poros da fase extratora pelos componentes da matriz, a utilização de solventes orgânicos para a eluição, variações analíticas entre cartuchos extratores e várias etapas operacionais para sua execução (QUEIROZ; LANÇAS, 2005).

Devido a essas desvantagens, houve um desenvolvimento de técnicas mais rápidas de preparo de amostras, principalmente para a análise de amostras em matrizes complexas. Porém, além da rapidez, outras características são requeridas para um bom método de preparo de amostras, tais como simplicidade, baixo custo, repetibilidade e ausência de solventes orgânicos. Algumas técnicas mais atuais, como extração com fluido supercrítico (SFE) e extração acelerada com solvente (ASE), têm cumprido alguns destes requisitos. Apesar da vantagem destas técnicas sobre aquelas clássicas, ainda continuam necessitando de grande quantidade de solvente para sua execução (FERNANDES, 2006).

Assim sendo, a miniaturização tornou-se uma das tendências dominantes em química analítica. Exemplos típicos de técnicas miniaturizadas de preparo de amostras incluem a microextração em fase sólida (SPME), extração por sorção em barra de agitação (SBSE), extração dinâmica em fase sólida (SPDE), micro extração por solvente empacotado (MEPS), micro extração em fase líquida (LPME), entre outras. Estas técnicas, quando usadas em combinação com sistemas analíticos, podem resultar em análises mais rápidas, com menor consumo de solvente por unidade de amostra, melhorando a sensibilidade do sistema. Na

maioria dos casos, as técnicas miniaturizadas de preparo de amostras também podem ser automatizadas e acopladas em linha com a análise, sendo que esse acoplamento *on-line* pode resultar em maior sensibilidade e menor potencial de perda de substâncias (KAWAGUCHI et al., 2006).

1.2 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

A microextração em fase sólida (SPME), desenvolvida por Pawliszyn e colaboradores, (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990) apresenta uma série de vantagens em relação aos métodos convencionais de extração, tais como, não requer instrumentação analítica sofisticada, apresenta rápido processo operacional, permite automação das análises, concentração dos analitos e reutilização das fibras extratoras. O dispositivo básico de SPME (Figura 1) consiste de uma fibra de sílica fundida de 10 mm de comprimento e 110-160 μm de diâmetro, recoberta com polímeros sorventes ou sólidos adsorventes, com espessuras de 7-100 μm (QUEIROZ; LANÇAS, 2005).

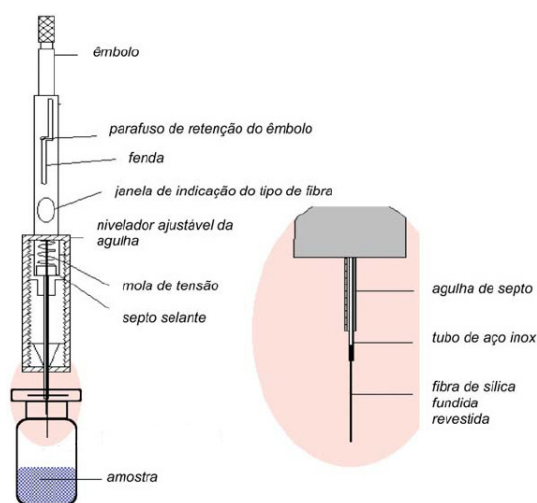


Figura 1 - Representação esquemática de uma seringa de SPME. Adaptado de (ALMEIDA et al., 2004).

A SPME é baseada no equilíbrio de partição do analito entre as fases: aquosa (amostra homogênea), polimérica (fibra extratora) e gasosa (*headspace*). Durante a extração em um sistema trifásico, considerado ideal, os analitos migram entre as três fases até que o equilíbrio de partição seja atingido. Desta forma, a massa extraída do analito pela fibra está relacionada ao equilíbrio de massas nas fases do sistema. A massa total do analito deverá permanecer constante durante a extração, podendo ser expressa pela equação:

$$C_0 V_s = C_f^e V_f + C_h^e V_h + C_s^e V_s$$

Onde C_0 indica a concentração inicial do analito na amostra, C_f^e , C_h^e , C_s^e as concentrações no estado de equilíbrio nas fases polimérica, gasosa e na aquosa (amostra), respectivamente. V_f , V_h , V_s os volumes das fases polimérica, gasosa e aquosa, respectivamente. Após rearranjos matemáticos, a quantidade de analito extraído (número de mols) após atingir o equilíbrio do sistema poderá ser expressa através da equação:

$$n = K V_f V_s C_0 / (K V_f + V_s)$$

Segundo esta equação, a quantidade de analito absorvido ou adsorvido pela fibra, após atingir o equilíbrio, está linearmente relacionada com a concentração inicial do analito na amostra, permitindo assim, a análise quantitativa (QUEIROZ, 2009).

Em análises realizadas por cromatografia gasosa (SPME-GC), após o processo de extração a fibra é inserida no injetor aquecido do cromatógrafo e os analitos são dessorvidos termicamente para a coluna cromatográfica; desta forma, as análises realizadas por SPME-GC não utilizam solventes orgânicos. A técnica SPME-GC, inicialmente desenvolvida para análise de poluentes em amostras de água, tem sido empregada com êxito na extração de fármacos voláteis e semi-voláteis em análises de amostras biológicas, principalmente quando

extraídos no modo *headspace*, onde não ocorre interação das proteínas da amostra biológica com a fibra. Já os fármacos menos voláteis ou termicamente instáveis têm sido analisados após processos de derivatização/SPME-GC ou empregando a técnica SPME acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência (SPME-HPLC). O acoplamento SPME-HPLC requer uma interface apropriada, em forma de T, onde a fibra é inserida na extremidade superior e as demais extremidades, lateral e inferior, são conectadas a uma válvula de seis pórticos do HPLC (Figura 2). A dessorção dos analitos pode ser realizada no modo dinâmico ou no modo estático. Neste, antes de eluir os analitos para a coluna cromatográfica, a fibra permanece na interface, em contato com um volume previamente estabelecido de fase móvel ou solvente orgânico, durante um intervalo de tempo (QUEIROZ; LANÇAS, 2005). No modo dinâmico, através de uma mudança na válvula, o solvente do sistema cromatográfico entra em contato contínuo com a fibra para dessorção dos analitos.

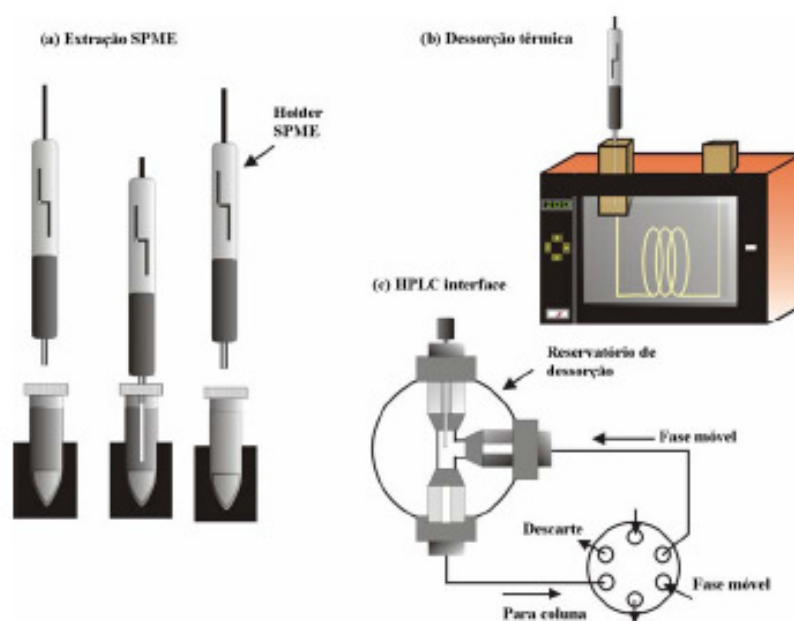


Figura 2 - a) Processo de extração SPME, b) Processo de dessorção térmica SPME-GC, c) processo de dessorção SPME-HPLC. Adaptado de (QUEIROZ; LANÇAS, 2005).

A técnica SPME tem sido aplicada para análise de fármacos em vários fluidos biológicos para diferentes fins, tais como monitorização terapêutica, estudo de farmacocinética, *doping* de atletas, *screening* de drogas ilícitas, entre outras. A Tabela 1 ilustra as recentes aplicações nesta área.

Tabela 1 - Recentes aplicações da técnica SPME-GC-MS para análise de fármacos em fluidos biológicos.

Fármacos	Matriz	Modo de extração	LOQ/LOD	Referência
metadona	plasma	DI (PDMS)	LD 40 ng/mL	BERMEJO et al.; 2000
anfetaminas	soro	DI + HS (PDMS)	LD 0,05 µg/mL	LEE et al.; 2000
anfetaminas	sangue	HS (PDMS)	LD 5 ng/mL	NAMERA et al.; 2000
drogas ilícitas	soro e urina	HS (PA)	LQ 10 µg/mL	STAERK; KULPMANN, 2000
midazolam	plasma	DI (PA)	LD 1 ng/mL	FRISON et al.; 2001
sulfentanil	plasma	DI (PDMS-DVB)	LQ 6 ng/mL	PARADIS et al.; 2002
busulfan	plasma	DI (CW-DVB)	LQ 20 ng/mL	ABDEL-REHIM et al.; 2003
cocaína	suor	DI (PDMS)	LD 5 ng/mL	FOLLADOR et al.; 2004
rivastigmina	plasma	DI (PDMS-DVB)	LQ 0,2 ng/mL	SHA et al.; 2004
ácido valpróico	plasma	HS (PDMS)	LQ 0,3 µg/mL	DENG et al.; 2006
paration ácido	urina e sangue	CW/DVB	LD 10 ng/mL	GALLARDO et al.; 2006
metilmalônico e glutárico	urina	HS (PDMS)	LD 21-34nM	LI et al.; 2007
tricloroetileno	sangue	HS (PDMS)	LD 0,25 ng/mL	LIU et al.; 2008
anfetaminas e cocaína	cabelo	HS (PDMS)	LD 0,01 ng/mg	MEROLA et al.; 2010

DI = extração direta
HS = headspace

1.2.1 Modos de extração

Três modos de extração podem ser realizados utilizando SPME: extração direta, em *headspace* e com proteção de membrana (Figura 3). No modo de extração direta, a fibra extratora é imersa diretamente na amostra e os analitos são transportados da matriz para a fase extratora. Para facilitar a extração se usa agitação para transportar os analitos da matriz para a superfície da fibra. No modo *headspace*, uma barreira de ar é suficiente para transportar os analitos e promover um rápido equilíbrio. Neste caso, o revestimento das fibras é protegido contra danos causados por interferentes de alta massa molecular tais como proteínas ou matérias húmicas presentes na amostra. Este modo permite a alteração do pH, sem danificar as fibras. Finalmente, o modo protegido por membrana é utilizado para a extração de analitos em amostras muito sujas, a fim de proteger a fase extratora de possíveis danos (ALPENDURADA, 2000).

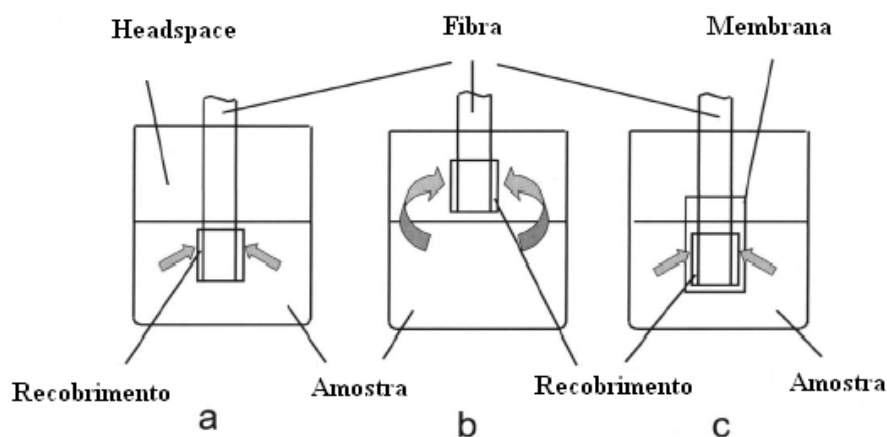


Figura 3 – Modos de extração em SPME: (a) direta, (b) headspace e (c) com proteção de membrana. Adaptado de (LORD; PAWLISZYN, 2000).

1.2.2 Mecanismos de extração

Existem dois tipos distintos de revestimentos de SPME disponíveis comercialmente. O mais usado é o polidimetilsiloxano (PDMS), um líquido de revestimento. Mesmo parecendo um sólido, é na realidade uma borracha líquida de alta viscosidade. O poliacrilato (PA) é um sólido cristalino de revestimento que se transforma em líquido nas temperaturas de desorção. Tanto o PDMS quanto o PA extraem os analitos através da absorção. Os demais revestimentos, incluindo Divinilbenzeno (PDMS-DVB), Carbowax-divinilbenzeno (CW-DVB), Carbowax-Templated Resin (CW-TR) e Carboxen, são revestimentos mistos, em que a fase extratora é um sólido poroso, extraindo os analitos através da adsorção (GORÉCKI; YU; PAWLISZYN, 1999). A Figura 4 ilustra a formação inicial e final do processo de extração por absorção e de adsorção.

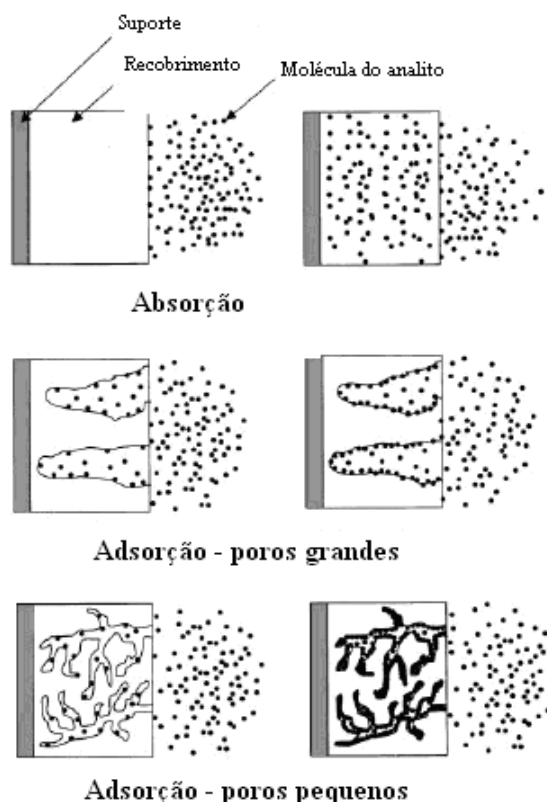


Figura 4 - Comparação de mecanismos de extração por adsorção e absorção. Diagramas da esquerda ilustram os estágios iniciais dos processos e diagramas da direita ilustram a condição de equilíbrio. Adaptado de (GORÉCKI; YU; PAWLISZYN, 1999).

Independentemente da natureza do revestimento, as moléculas do analito se ligam inicialmente na superfície. Posteriormente, o que determinará se os analitos migrarão para o interior do revestimento ou se permanecerão na superfície, será a magnitude dos coeficientes de difusão do analito no revestimento. Os coeficientes de difusão de moléculas orgânicas em PDMS são próximos daqueles em solventes orgânicos; portanto a difusão em PDMS é relativamente rápida e este revestimento extrai analitos através da absorção. Os coeficientes de difusão em PA são uma ordem de magnitude menor, mas suficientemente altos para o mecanismo primário de extração ser a absorção. Por outro lado, os coeficientes de difusão de moléculas orgânicas em divinilbenzeno e Carboxen são tão pequenos que, dentro do tempo empregado para análise em SPME, todas as moléculas tendem a permanecer na superfície do revestimento (GORÉCKI; YU; PAWLISZYN, 1999).

Nos recobrimentos sólidos porosos, a extração dos analitos é feita principalmente por interações intermoleculares fracas. O número de sítios ativos onde a adsorção pode ocorrer é limitado. Quando todos esses sítios estão ocupados, os analitos não podem ser aprisionados. Isto significa que a dependência entre a concentração do analito em uma amostra e da quantidade do analito extraído pela fibra de SPME não pode ser linear em ampla faixa de concentração. Além disso, enquanto a absorção é um processo não competitivo, a adsorção é por definição competitiva, e uma molécula com maior afinidade pelo revestimento pode deslocar uma molécula com menor afinidade. Assim, a quantidade do analito extraído pela fibra pode ser significativamente afetada pela composição da matriz da amostra ((GORÉCKI; YU; PAWLISZYN, 1999).

1.2.3 Parâmetros experimentais que afetam a eficiência da extração

Vários parâmetros experimentais podem influenciar a quantidade de analito extraído da matriz para a fase extratora. Ao lidar com análise de fármacos em fluidos biológicos, alguns destes parâmetros devem ser avaliados e otimizados para que se obtenha o máximo de desempenho da técnica.

1.2.3.1 Fase extratora

A afinidade da fase extratora pelo analito é o fator mais importante no desenvolvimento de um método utilizando SPME. A seleção do revestimento é baseada, principalmente, na polaridade e na volatilidade do analito. Tanto a espessura da fase extratora quanto a constante de distribuição determinam a sensibilidade do método e o tempo de extração. Revestimentos espessos oferecem aumento de sensibilidade, mas requerem muito mais tempo para atingir o equilíbrio. Portanto, é importante usar a fase extratora adequada para uma determinada aplicação (QUEIROZ; LANÇAS, 2004).

As fibras mais populares são aquelas revestidas com 7-100 μm de PDMS como fase extratora. O equilíbrio de partição nesta fase é correlacionado com o coeficiente de distribuição octanol/água (K_{ow}). Estes estudos demonstram que para solutos com K_{ow} baixo, baixas recuperações são obtidas. Esta recuperação é devida principalmente à relação entre a fase aquosa e a fase extratora (QUEIROZ; LANÇAS, 2004). A Tabela 2 apresenta as fibras comercialmente disponíveis mais populares.

Tabela 2 - Fibras para SPME disponíveis comercialmente: usos, propriedades e aplicações. Adaptada de (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

Fibra	Espessura do filme (μm)	Uso recomendado	Temperatura máxima ($^{\circ}\text{C}$)	Aplicações
	100	GC, HPLC	280	
PDMS	30	GC, HPLC	280	Compostos apolares
	7	GC, HPLC	340	
PA	85	GC, HPLC	320	Compostos polares
	65	GC, HPLC	270	Hidrocarbonetos aromáticos,
PDMS/DVB	60	GC	270	aminas aromáticas, VOCs
CXEN/PDMS	75	GC	320	VOCs, hidrocarbonetos
CW/DVB	65	GC	260	Compostos polares
CW/TR	50	HPLC		Surfactantes, aminas aromáticas

1.2.3.2 Força Iônica

A adição de sal em uma solução pode ter diferentes efeitos sobre os analitos. Quando sal é adicionado à solução, moléculas de água formam esferas de hidratação ao redor dos íons de sal. Este efeito reduz a disponibilidade de moléculas de água livres para dissolver o analito. Como consequência, a concentração efetiva de analitos na solução aumenta e mais analitos irão se distribuir na fibra de extração, de acordo com o efeito *salting-out*. Por outro lado, como a concentração de sal continua a aumentar, este pode interagir com os analitos em solução através de interações eletrostáticas, reduzindo a capacidade do analito de migrar para a fase extratora, diminuindo a quantidade de analito extraído (QUEIROZ; LANÇAS, 2004).

Inicialmente, o processo predominante deve ser a interação das moléculas de sal com a água. Porém, como a concentração de sal tende a aumentar, estas moléculas começam a

interagir com os analitos em solução. Portanto, é razoável que haja um aumento inicial na extração dos analitos com o aumento da concentração de sal, seguido por uma diminuição na extração devido às interações do sal com os analitos em solução (LORD; PAWLISZYN, 2000).

Deve-se ter cuidado com a alta concentração de sal na matriz da amostra, devido à deposição de sal sobre a fibra que diminui a eficiência da extração ao longo do tempo (QUEIROZ; LANÇAS, 2004).

1.2.3.3 Efeito do pH

O pH da amostra deve ser ajustado para otimizar o método SPME de qualquer substância ácida ou básica. Este está relacionado ao fato de que apenas a forma não-ionizada dos analitos pode ser extraída pelas fibras extratoras, por isso em alguns casos o pH da amostra é controlado por uma solução tampão (LORD; PAWLISZYN, 2000). Portanto, ajustando devidamente o pH, ácidos e bases fracas podem ser convertidos em sua forma neutra, que lhes permite serem extraídos pela fibra de SPME. Porém, alguns cuidados devem ser tomados quando é usada extração no modo direto, pois valores extremos de pH (menor que 2 e maior que 10) podem danificar o revestimento da fibra (QUEIROZ; LANÇAS, 2004).

1.2.3.4 Tempo de extração

A otimização da extração pode ser feita através da determinação do tempo necessário para uma substância atingir o equilíbrio entre a matriz e a fase extratora da fibra. Para compostos com baixo coeficiente de partição, o tempo para alcançar o equilíbrio é mais

longo. No entanto, o tempo de extração e as condições de transferência de massa devem ser controlados para garantir uma boa precisão. O equilíbrio de extração em geral é alcançado entre 15 e 30min para a maioria dos fármacos em plasma, sendo essa uma das principais vantagens da SPME (QUEIROZ; LANÇAS, 2004).

1.2.3.5 Efeito da temperatura

Ao aumentar a temperatura de extração, diminui-se o coeficiente de partição dos analitos entre o revestimento da fibra e a matriz, ou seja, há uma diminuição da quantidade de analito extraído. No entanto, em contrapartida, um aumento na temperatura também pode aumentar o coeficiente de difusão do analito através da redução da viscosidade do meio, reduzindo o tempo de equilíbrio para extração. O efeito sobre a temperatura pode ser mais importante para análises realizadas em plasma do que em água ou urina devido à maior viscosidade dessa matriz. Portanto, os métodos de SPME podem ser otimizados selecionando temperaturas de extração na qual uma sensibilidade satisfatória é alcançada em um período de tempo aceitável (QUEIROZ; LANÇAS, 2004).

1.2.3.6 Agitação da amostra

A eficácia da agitação da amostra determina o tempo para se atingir o equilíbrio em amostras aquosas. As técnicas de agitação mais empregadas em SPME são: agitação magnética, que requer uma barra de agitação no interior do *vial*; vórtex, onde o *vial* é submetido a movimentos circulares; movimento da fibra, fluxo constante e ultra-som. A agitação magnética é mais utilizada em SPME devido à disponibilidade em laboratórios

analíticos e também por poder ser utilizada em diferentes modos de SPME (ALPENDURADA, 2000).

1.2.3.7 Proteínas do plasma

As proteínas plasmáticas diminuem a recuperação da extração, indicando uma perturbação no processo de extração. Compostos de alta massa molecular, como as proteínas, podem ocasionar adsorção irreversível na fibra, alterando assim as propriedades da fase extratora e tornando-a inutilizável. A precipitação de proteínas tem sido utilizada para liberar os analitos do plasma através da acidificação ou adição de metanol. A sensibilidade da SPME também pode ser melhorada consideravelmente através da diluição das amostras de plasma com qualquer solução tampão ou água. Essa diluição aumenta o coeficiente de difusão dos analitos das amostras de plasma para o revestimento polimérico (QUEIROZ; LANÇAS, 2004).

1.2.3.8 Dessorção dos analitos

A dessorção em cromatografia gasosa é realizada inserindo a fibra de SPME no injetor do cromatógrafo aquecido ocorrendo, assim, a dessorção térmica dos analitos. O aumentando da temperatura diminui o coeficiente de partição do analito entre a fibra e a amostra. Desse modo, a temperatura, o tempo de dessorção, e a posição da agulha no injetor do GC são os principais fatores que afetam a dessorção térmica dos analitos da fibra de SPME (QUEIROZ; LANÇAS, 2004).

1.3 ANÁLISE DE FÁRMACOS EM FLUIDOS BIOLÓGICOS

A determinação de fármacos em amostras biológicas, principalmente plasma, coletadas com base no contexto clínico e nos princípios da farmacocinética, tem sido um procedimento usual na área clínica, para assegurar a eficácia terapêutica e minimizar os efeitos adversos (sintomas de toxicidade) dos fármacos prescritos (QUEIROZ; LANÇAS, 2005).

Os fluidos biológicos são matrizes complexas que contêm proteínas, sais, ácidos, bases e compostos orgânicos endógenos com propriedades semelhantes aos analitos, sendo estes presentes em baixa concentração (KATAOKA, 2003). Embora as análises farmacêuticas sejam realizadas utilizando sistemas altamente eficientes, um processo de preparo de amostra geralmente é necessário para extrair e isolar os analitos de interesse dessas matrizes complexas (FU; LIAO; LIU, 2005).

A análise de fármacos em fluidos biológicos tem se tornado importante atualmente com o desenvolvimento de fármacos mais seletivos e efetivos; e também com a necessidade de entender mais sobre seus efeitos tóxicos e terapêuticos. O conhecimento dos níveis dos fármacos em fluidos biológicos permite a otimização da terapêutica e fornece informações para estudos de farmacocinética, biodisponibilidade, bem como suas interações medicamentosas (KATAOKA, 2003).

A análise quantitativa e qualitativa de fármacos e seus metabólitos é muito aplicada em estudos farmacocinéticos, na aprovação de novos fármacos e desenvolvimento de novas formulações. Além disso, a monitorização terapêutica de fármacos é usada como ferramenta para melhoria da terapia medicamentosa (KATAOKA, 2003).

A monitorização terapêutica é fundamentada no fato de que a resposta terapêutica se correlaciona e depende da concentração do fármaco na corrente sanguínea do usuário. O uso

de doses regulares em intervalos periódicos não significa que existirão níveis constantes em todos os pacientes, devido às diferenças individuais de absorção, metabolismo, excreção e biodisponibilidade para o fármaco administrado, influenciando o efeito terapêutico final. Além disso, em alguns casos a faixa terapêutica, que indica valores de concentração para os quais a substância tem utilidade farmacológica, apresenta frágil distanciamento da faixa tóxica, na qual surgem complicações no quadro de saúde do paciente que podem levar à intoxicação e, posteriormente à morte. Portanto, faz-se necessária a monitorização terapêutica do fármaco na corrente sanguínea. Essa monitorização traz como vantagem a possibilidade de ajustes nas doses do medicamento, prevenindo a intoxicação, caso em que a concentração do fármaco está acima da faixa terapêutica; e garantindo os efeitos farmacológicos do composto, evitando que a concentração fique abaixo da mesma (OLIVEIRA et al., 2004).

1.4 ESTATINAS

1.4.1 Estatinas no tratamento da hiperlipidemia

A hiperlipidemia, elevação da concentração de lipídios no plasma é a manifestação de um distúrbio na síntese e degradação de lipoproteínas plasmáticas. Os principais lipídios de relevância em hiperlipidemia são o colesterol e o triglicérides. O colesterol desempenha um papel crucial na manutenção da integridade da membrana celular e das funções fisiológicas do corpo, incluindo a síntese do hormônio esteróide. Por outro lado, os elevados níveis de concentração do colesterol estão associados com condições patológicas, como a aterosclerose (Figura 5), caracterizado pela deposição de colesterol na parede arterial (ERTURK; ONAL; CETIN, 2003).

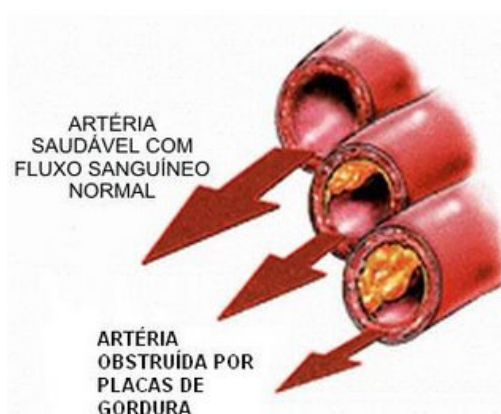


Figura 5 - Aterosclerose: obstrução das artérias pelo acúmulo de lipídeos em suas paredes. Disponível em <http://longevidade-silvia.blogspot.com/2010/06/arteriosclerose-ou-aterosclerose.html>

A maioria dos efeitos da aterosclerose é o aumento na incidência de Doença Arterial Coronariana (DAC) e na taxa de mortalidade relacionada a ela. Estudos mostraram que 38-42% de todas as mortes estão relacionadas a doenças cardiovasculares. Portanto, baixar os níveis de colesterol pode inverter a aterosclerose em todos os leitos vasculares e diminuir a mortalidade associada a ela. Cada 10% de redução nos níveis de colesterol está associado com 20-30% de redução na incidência de doenças coronárias (ERTURK; ONAL; CETIN, 2003).

Os principais métodos de tratamento da hiperlipidemia são dietas, mudanças no estilo de vida e administração de drogas hipolipemiantes (ERTURK; ONAL; CETIN, 2003). Dentre elas, as estatinas são os fármacos mais utilizados para o tratamento da hiperlipidemia, com o propósito de diminuir os níveis de lipoproteínas plasmáticas ricas em colesterol e reduzir os riscos de DAC. Estes efeitos são resultantes da atividade inibidora das estatinas sobre a enzima HMG-CoA redutase (hidroximetilglutaril-CoA redutase), com a função de bloquear a conversão do substrato HMG-CoA em ácido mevalônico (Figura 6), inibindo os primeiros passos da biossíntese do colesterol (CAMPO; CARVALHO, 2007).

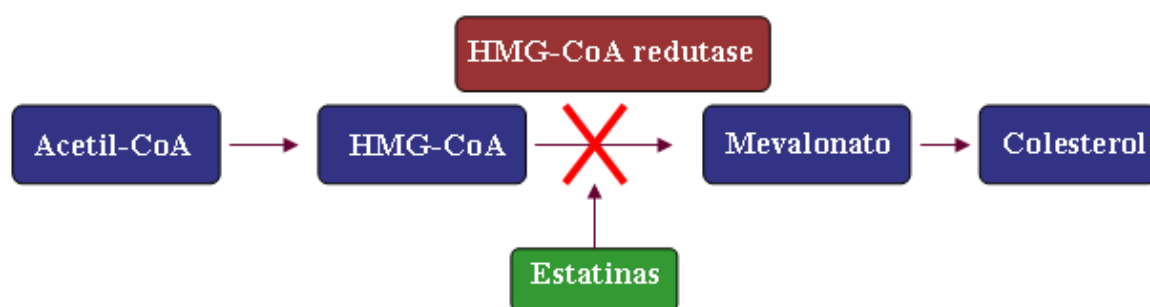


Figura 6 - Síntese do mevalonato mostrando o local da ação das estatinas que inibem a HMG-CoA redutase, a taxa de limitação da enzima na síntese do colesterol. Adaptado de (WHEELER, 1998).

Os inibidores da HMG-CoA redutase, as estatinas, disponíveis atualmente são a sinvastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina. A sinvastatina e pravastatina são estruturalmente similares e produzidas por processos semi-sintéticos a partir da lovastatina e mevastatina, respectivamente. A fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina são moléculas totalmente sintéticas e têm estruturas distintas das outras estatinas. As estruturas químicas das estatinas são mostradas na Figura 7.

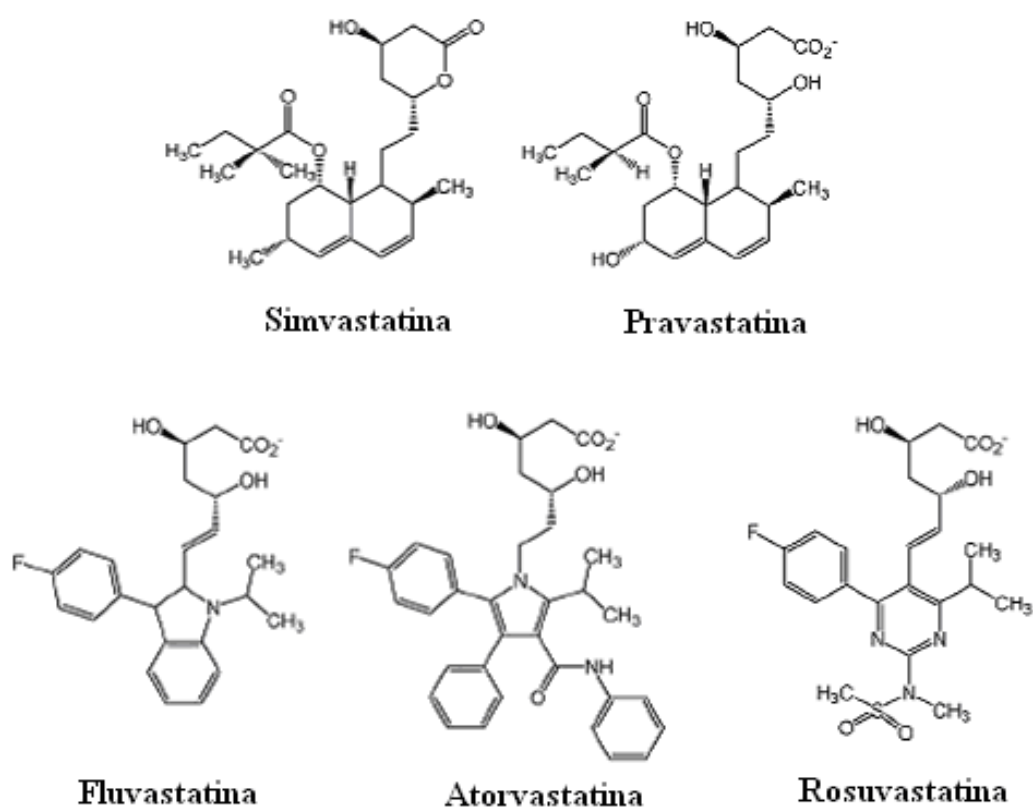


Figura 7 - Estrutura química das estatinas. Adaptado de (NIROGI; MUDIGONDA; KANDIKERE, 2007).

1.4.2 Absorção, metabolismo e excreção

A pravastatina, atorvastatina, fluvastatina e rosuvastatina são administradas na forma ativa como anéis abertos. Estes medicamentos são absorvidos pelo trato gastrointestinal e sofrem metabolismo de primeira passagem no fígado. A fluvastatina e atorvastatina estão vinculadas às proteínas plasmáticas em mais de 98% e a pravastatina em cerca de 50%. Esses medicamentos são excretados nas fezes principalmente através da bÍlis, com uma proporção menor excretada na urina. Já a sinvastatina é administrada na forma inativa como lactona, é absorvida pelo trato gastrintestinal e hidrolisada na forma ativa de β -hidróxi ácido no fígado. Ambos, fármaco e metabólito β -hidróxi ácido estão extensamente vinculados às proteínas plasmáticas em torno de 95%. Cerca de 85% da dose administrada é excretada como metabólito a partir das fezes e cerca de 15% a partir da urina, como forma inativa (ERTURK; ONAL; CETIN, 2003). Dados importantes a respeito de algumas estatinas são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Dados farmacocinéticos de algumas das estatinas (DOMENIC et al., 2002).

	Sinvastatina	Pravastatina	Fluvastatina	Atorvastatina
Origem	semi-sintética	semi-sintética	sintética	sintética
Forma lactona	sim	não	não	não
Log P (octanol/água)	4,7 (47,860)	-0,2 (0,6)	3,2 (1738)	4,1 (1482)
Dosagem	5-80 mg	5-40 mg	20-80 mg	10-80 mg
Absorção	60-85%	35%	98%	30%
Biodisponibilidade	<5%	17%	10-35%	12%
t_{max}	1,3-2,4h	0,9-1,6h	0,5-1,5h	2,0-4,0h
Tempo meia vida	1,9-15,6h	0,8-3,0h	0,5-2,3h	11-30h
Ligação protéica	95%	48%	>99%	>98%
Extração hepática	78-87%	66%	68%	>70%

log P = logaritmo do coeficiente de partição baseado na fase octanol/água
t_{max} = tempo necessário para alcançar o pico de concentração no plasma

1.4.3 Uso terapêutico e efeitos adversos

As estatinas são prescritas em uma perspectiva de longo prazo; no entanto, as possíveis interações com outros fármacos merecem atenção, pois muitos pacientes normalmente fazem uso concomitante de múltiplas drogas durante o tratamento com as estatinas. Em nível farmacodinâmico, as estatinas não estão propensas à interferência com outros fármacos. Em nível farmacocinético, no entanto, as interações podem afetar os processos pelo qual as estatinas são absorvidas, distribuídas, metabolizadas, e excretadas (PAOLETTI; CORSINI; BELLOSTA, 2002).

As estatinas são geralmente bem toleradas, sendo muito baixa a ocorrência de efeitos adversos que obriguem a interrupção de tratamento (incidência de 2% independentemente do tipo de estatina utilizado). Assim, efeitos colaterais não são freqüentes, porém um dos mais sérios está relacionado à ação hepatotóxica, com possível aumento das enzimas aspartato e alanina transaminase. Miopatias, com evolução a rabdomiólises e insuficiência renal, são raras, mas são efeitos graves associados ao uso de estatinas. (CAMPO; CARVALHO, 2007). A incidência de rabdomiólise é dependente da dose administrada e é aumentada quando os inibidores da HMG-CoA redutase são utilizados em combinação com agentes que dividem as vias metabólicas (PAOLETTI; CORSINI; BELLOSTA, 2002; ERTURK; ONAL; CETIN, 2003).

Dessa maneira, as interações medicamentosas podem ser previsíveis dada a compreensão sobre a farmacologia do fármaco envolvido. A diferença em seus perfis farmacocinéticos constitui a razão para a escolha de uma estatina específica adequada para a terapia. Portanto, o conhecimento de suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas pode levar a um uso racional e maior compreensão de seus potenciais benefícios. (ERTURK; ONAL; CETIN, 2003). A Tabela 4 relaciona casos de rabdomiólise com o uso de algumas estatinas.

Tabela 4 - Relatos de rabdomiólise associados com estatinas (HELFENSTEIN, 2005).

Estatina	Fármacos associados
Simvastatina	Mibefradil, fibratos, ciclosporina, warfarina, antibióticos macrolídeos, digoxina, antifúngicos, clorzoxazona, nefazodona, niacina, tacrolimus, ácido fusídico
Atorvastatina	Mibefradil, fibratos, antibióticos macrolídeos, warfarina, ciclosporina, digoxina, antifúngicos
Pravastatina	Fibratos, antibióticos macrolídeos, warfarina, ciclosporina, digoxina, mibefradil, niacina
Fluvastatina	Fibratos, warfarina, digoxina, mibefradil

1.4.4 Métodos analíticos para determinação quantitativa de estatinas

Apesar das estatinas serem estruturalmente semelhantes, métodos analíticos para sua determinação quantitativa em plasma têm sido desenvolvidos individualmente para cada fármaco devido suas diferentes solubilidades, estabilidade e características físico-químicas.

Quase todos os métodos desenvolvidos para separação das estatinas são baseados em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou cromatografia gasosa (GC), sendo HPLC o método mais popular para esse tipo de análise. Na maioria das vezes utiliza-se um detector de ultra violeta (UV) ou um detector de massas (MS). Algumas etapas de preparo de amostra são utilizadas antes da amostra ser injetada no sistema cromatográfico como extração líquido líquido ou extração em fase sólida. Além disso, alguns procedimentos de derivatização são usados para aumentar a sensibilidade em alguns métodos.

Por meio de um levantamento bibliográfico efetuado pode-se constatar que já estão descritos alguns métodos analíticos para determinação quantitativa de estatinas em plasma humano. A Tabela 5 resume os métodos mais recentes envolvendo as estatinas presente neste estudo (simvastatina, fluvastatina e atorvastatina).

Tabela 5 – Métodos analíticos empregados para determinação quantitativa de estatinas.

Estatina	Matriz	Modo de extração	Análise	LOQ (ng/mL)	Referência
ATOR	plasma	LLE	LC/MS	0,1	NIROGI et al., 2006
ATOR	plasma	LLE	LC/MS/MS	0,1	BOREK, et al., 2006
ATOR	plasma	SPE	LC/MS	0,2	HERMANN, et al., 2005
ATOR	plasma	LLE/SPE	LC/MS	0.1	GUILLÉN, et al., 2009
ATOR	soro	LLE	HPLC/UV	4,0	BAHRAMI, et al., 2005
ATOR/SIM	plasma	SPE	UHPLC/MS	0,08	NOVÁKOVÁ, et al., 2009
ATOR/SIM	plasma	SPE	LC/MS/MS	0,05	NOVÁKOVÁ, et al., 2008
SIM	plasma	SPE	LC/MS/MS	0,05	YANG, et al., 2005
SIM	plasma	LLE	LC/MS/MS	0,1	PATEL, et al., 2008
SIM	plasma	SPE	LC/MS	0,05	YANG, et al., 2003
SIM	plasma	SPE	LC/MS/MS	0,1	BARRETT, et al., 2006
SIM	plasma	SPE	LC/MS/MS	0,5	JEMAL et al., 2000
SIM	plasma	LLE	LC/MS/MS	0,05	ZHANG, et al., 2004
SIM	plasma	LLE	LC/MS	0,1	YANG, et al., 2003
FLU	plasma	LLE	GC/MS	2,0	LEIS, et al., 2005
FLU	plasma	SPE	LC/MS	2,0	NIROGI et al., 2006
FLU	plasma	LLE	LC/MS/MS	1,5	PIETRO, et al., 2006

1.5 DERIVATIZAÇÃO

As principais limitações da cromatografia gasosa podem ser contornadas através da derivatização, (tais como a elevada polaridade, baixa volatilidade e/ou estabilidade térmica de alguns compostos orgânicos). Assim, muitas moléculas excluídas da análise por cromatografia gasosa quando no estado “livre”, podem ser adequadamente analisadas na forma de um derivado. Compostos contendo massa molecular elevada e grupos polifuncionais

não são, usualmente, adequados à análise direta por cromatografia gasosa. Em geral, estes grupos funcionais tornam o composto bastante polar e reduzem sua volatilidade dificultando sua análise. Um exemplo é a análise de ácidos carboxílicos, os quais apresentam elevada polaridade e moderada solubilidade em água, dificultando a obtenção de bons resultados quantitativos em baixas concentrações. A conversão dos ácidos em ésteres metílicos permite uma análise quantitativa segura, transformando o grupo hidroxila (OH) da carbonila (COOH) em grupo metoxi (OCH₃). Neste caso diminui-se a polaridade da molécula, aumentando-se sua volatilidade e reduzindo significativamente o tempo de análise (LANÇAS, 1993).

O uso da derivatização em microextração em fase sólida (SPME) tornou possível baixos limites de detecção (LOD) na determinação de substâncias de baixa volatilidade e instabilidade térmica. O uso mais comum da derivatização em SPME é o tratamento de compostos polares visando aumentar sua recuperação na matriz da amostra, assim como melhorar a separação cromatográfica e a seletividade e/ou sensibilidade dos métodos analíticos (STASHENKO; MARTINEZ, 2004).

1.6 PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS

Em um sistema analítico, diversos fatores ou variáveis podem influenciar a resposta desejada. Portanto, deve-se selecionar as variáveis a serem estudadas que interferem no sistema e estimar sua influência no resultado do estudo. Essa otimização dos parâmetros experimentais é uma das etapas mais críticas do trabalho científico. Diferentes métodos podem ser utilizados na otimização dos parâmetros experimentais, dentre eles o método do planejamento fatorial.

1.6.1 Planejamento fatorial completo

O planejamento fatorial permite avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais. Nestes ensaios são investigadas a influência de todas as variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação na resposta obtida. Se a combinação de k fatores é investigada em dois níveis, o planejamento fatorial consistirá de 2^k experimentos. Normalmente, os níveis dos fatores quantitativos são nomeados pelos sinais – (menos) para o nível mais baixo e + (mais) para o nível mais alto. Um nível (O) pode ser também incluído no centro, no qual todas as variáveis estão no seu valor médio. Esses centros experimentais incluídos em planejamentos fatoriais possibilitam a identificação de relações não lineares no intervalo estudado e a estimativa do erro experimental, sem a necessidade de replicata de todo o planejamento (SUCHARA, 2007).

No entanto, o número de ensaios necessários para a execução de um planejamento fatorial completo aumenta rapidamente com k , o número de fatores investigados. Neste caso, a informação desejada muitas vezes pode ser obtida a partir de um número de ensaios bem menor realizando um planejamento fatorial fracionário, em que pode determinar os efeitos principais e de interações mais importantes (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995, 2007).

1.6.2 Planejamento fatorial fracionário

O planejamento fatorial completo apresenta como principal desvantagem o grande número de ensaios que devem ser realizados a cada fator adicionado ao estudo. Dessa forma, planejamentos fatoriais fracionários são usados a fim de diminuir o número de experimentos realizados, tornando possível extrair informações dos efeitos mais importantes e obter as

mesmas conclusões caso fosse realizado um planejamento fatorial completo (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Após a realização dos experimentos, os fatores significativos são selecionados e uma metodologia de análise de superfícies de respostas pode ser executada para otimização do experimento. Neste sentido, otimizar significa encontrar os valores das variáveis que irão produzir a melhor resposta desejada, isto é, encontrar a região ótima na superfície definida pelos fatores, sendo o Planejamento Composto Central (CCD – *Central Composite Design*) um dos planejamentos mais utilizados para ajustar modelos quadráticos (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

1.6.3 Planejamento composto central

Os planejamentos compostos centrais (CCD) foram apresentados como uma evolução dos planejamentos 3^3 , que necessitavam de muitos experimentos para um pequeno número de fatores, mesmo para planejamentos fatoriais fracionários (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

O planejamento composto central é na verdade um planejamento fatorial completo em dois níveis (2^k) acrescido de alguns pontos experimentais que permitem estimar os coeficientes de uma superfície de segunda ordem (SUCHARA, 2007). O planejamento em estrela (Figura 8) é um exemplo de planejamento composto central para dois fatores ($k = 2$).

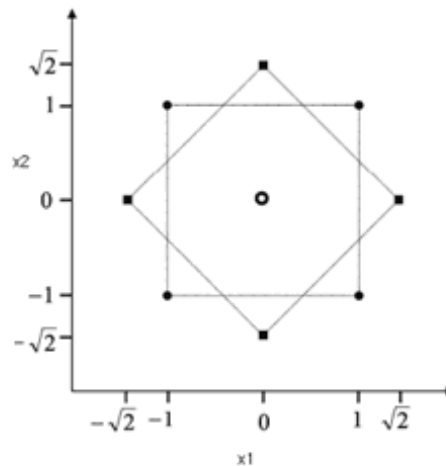


Figura 8 - Planejamento em estrela para duas variáveis, onde x_1 e x_2 representam os valores das variáveis estudadas. Adaptado de (SUCHARA, 2007).

Para construção de um planejamento CCD é necessário definir o número de variáveis a ser estudadas (k), qual planejamento fatorial será empregado (completo 2^k ou fracionário 2^{k-b}) e quantos experimentos serão realizados no ponto central ($2k$). O número de experimentos a ser realizado é dado por $2^k + 2k + 1$. Observe que neste tipo de planejamento, os níveis α (pontos axiais) necessitam ser decodificados para os valores experimentais dos níveis das variáveis a serem estudadas e para isso utiliza-se a seguinte equação:

$$x_i = \frac{(z_i - \bar{z})}{\frac{\Delta z}{2}}$$

em que x_i é o valor codificado do planejamento CCD, z_i o valor experimental do nível, \bar{z} o valor médio entre os níveis mais (+) e menos (-), que é exatamente o valor do nível zero (0) e Δz é a diferença entre os níveis mais (+) e menos (-).

2

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolvimento, otimização e validação de um método analítico para análise de estatinas em plasma humano através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas utilizando SPME e derivatização *in situ* na etapa de preparo de amostra.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método para análise de estatinas em plasma humano empregando o acoplamento SPME-GC-MS.
- Estudar o processo de derivatização *in situ* das estatinas para análise em GC.
- Otimizar as condições da extração SPME tais como tempo de extração, pH, temperatura de extração, força iônica e volume de tampão.
- Otimizar as condições da derivatização *in situ* tais como pH, volume de agente derivatizante e volume de reagente pareador iônico.
- Validar o método SPME-GC-MS avaliando parâmetros como seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e recuperação.

2.3 RELEVÂNCIA DO TRABALHO

As estatinas são fármacos amplamente utilizados no tratamento da hiperlipidemia. Elas apresentam um efeito redutor do colesterol e podem reduzir significativamente a morbidade e a mortalidade associada às doenças coronárias. Esses fármacos são eficazes inibidores da HMG-CoA redutase, enzima que catalisa a conversão de HMG-CoA a mevalonato, um passo limitante na via biossintética do colesterol. No entanto, algumas estatinas podem apresentar uma série de efeitos adversos, tais como a miopatia ou rabdomiólise. Assim, torna-se necessário a monitorização terapêutica a fim de estabelecer e controlar o esquema de dosagem adequado, minimizando tais efeitos adversos.

Técnicas analíticas como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) apresentam diversas aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. Entretanto, faz-se necessário o uso de técnicas de preparo de amostras antes da introdução no GC, sendo a microextração em fase sólida (SPME) uma importante tendência na miniaturização dessas técnicas. A SPME integra a amostragem, extração e concentração dos analitos em uma única etapa, e quando usada em combinação com sistemas analíticos gera análises mais rápidas, com menor consumo de solventes e livre de interferentes. Além disso, a SPME é adequada para reações de derivatização, podendo-se obter baixos limites de quantificação, bons níveis de recuperação e melhor separação e resolução cromatográfica. Visto que a utilização da técnica SPME juntamente com GC-MS na determinação de estatinas em plasma humano ainda não foi explorada, este estudo relata um método para análise de estatinas em plasma humano através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas utilizando SPME e derivatização *in situ*.

3

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E PADRÕES

Os padrões analíticos das estatinas tais como atorvastatina cálcica (Pfizer), fluvastatina sódica (Novartis) e sinvastatina (Medley) foram gentilmente doados pelo professor Dr. Anil Kumar Singh da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF - USP).

Utilizou-se também ácido acético (J.T.Baker), ácido fórmico (Synth), hidróxido de sódio (Mallinckrodt), acetato de amônio (J.T.Baker), tetrabutilamônio hidrogeno sulfato (Alfa Aesar), brometo de tetrabutilamônio (Vetec), dimetil sulfato (Sigma), dietil sulfato (Alfa Aesar), metanol (J.T.Baker) e etanol (J.T.Baker). Todos os solventes e reagentes usados possuíam grau HPLC ou analítico. A água utilizada para preparar todas as amostras e soluções foi purificada em um sistema Elga Ultra OS Purification.

3.2 AMOSTRAS ANALISADAS

As amostras de plasma humano branco, livres de estatinas e sorologicamente negativas para hepatite B e C, HIV, chagas e sífilis, foram gentilmente cedidas pela Casa de Saúde e pelo Laboratório Médico Dr. Maricondi de São Carlos sendo mantidas congeladas no freezer a -20°C.

3.3 MATERIAIS

- Holder manual para fibras de SPME (Supelco)
- Fibras de PA, PDMS, PDMS/DVB e CW-DVB para SPME (Supelco)
- Membranas para filtração hidrofílica 0,45 μm (Schleicher & Schuell)
- Frasco de vidro transparente para SPME de 10 e 20 mL (Shimadzu)
- Septo de PTFE/silicone (Shimadzu)
- Lacre de alumínio
- Barra de agitação magnética

3.4 INSTRUMENTAÇÃO

- Balança analítica modelo AG285 (Mettler Toledo)
- pHmetro modelo B-374 (Micronal)
- Agitador magnético VWR Scientific Products
- Banho de água termostaticado (Quimis)
- Lavadora ultra-sônica Ultra Cleaner (Unique)
- Centrífuga LS-3 Plus (Celm)
- Balões volumétricos de 5, 10 e 25 mL (Pyrex)
- Sistema GC-MS QP 5000 (Shimadzu)

3.5 MÉTODOS

3.5.1 Preparo dos padrões analíticos

Inicialmente foram preparadas soluções estoque de fluvastatina, simvastatina e atorvastatina em etanol na concentração de 1000 mg L^{-1} , as quais foram mantidas sob refrigeração a 4°C . Essas soluções foram diluídas em soluções de trabalho na concentração de 10 mg L^{-1} e a partir desta foi feito a fortificação das amostras de plasma para o desenvolvimento e otimização do método cromatográfico.

3.5.2 Preparo das amostras em plasma

Para os testes iniciais utilizou-se água ao invés de plasma a fim de facilitar os procedimentos de derivatização e extração. Desenvolvido o método em água, passou-se para as amostras de plasma humano branco. Essas amostras foram centrifugadas a 8000 rpm durante 5 minutos, filtradas com membrana hidrofílica de $0,45 \mu\text{m}$, estocadas em frascos e armazenadas no freezer a -20°C .

Para se obter a concentração de 1 mg L^{-1} , alíquotas adequadas das soluções de trabalho de simvastatina, fluvastatina e atorvastatina foram transferidas para frascos de vidro transparente para SPME de 20 mL, secas sob fluxo de nitrogênio e em seguida ressuspensas em 1 mL de plasma branco.

3.5.3 Derivatização das estatinas

Para a etapa de derivatização utilizou-se um agente pareador iônico (TBA-Br) a fim de formar um par iônico neutro com os analitos presente na amostra, e um reagente derivatizante (dietil sulfato) para que o produto final estivesse na forma de éster, mais facilmente de ser analisado por GC. A derivatização foi realizada simultaneamente com a etapa de extração, expondo a fibra de SPME à matriz da amostra contendo o reagente derivatizante. Esta etapa, não só melhora a detecção de compostos polares em cromatografia gasosa, mas também influencia na distribuição dos analitos entre a amostra e o revestimento da fibra de SPME.

A Figura 9 contém o esquema geral da reação de derivatização de um ácido carboxílico com brometo de tetrabutilamônio e dietil sulfato, formando um éster etílico como produto final.

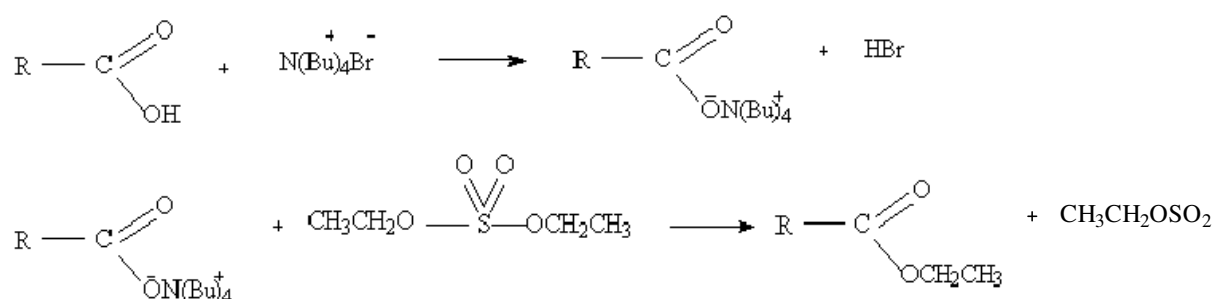


Figura 9 – Esquema geral da reação de derivatização de ácidos carboxílicos com brometo de tetrabutilamônio e dietil sulfato formando ésteres etílicos.

3.5.4 Condições cromatográficas

Desenvolveu-se os seguintes parâmetros para análise das estatinas no GC-MS QP5000:

- Injetor: *split/splitless*
- Modo injeção: *splitless* (3 minutos)
- Temperatura do injetor: 260°C
- Temperatura da interface: 310°C
- Coluna: Rtx®-5MS (15m × 0,25mm × 0,25µm), 5% fenildimetilpolisiloxano
- Temperatura da coluna: 80°C (2min), 30°C/min até 300°C (4min)
- Gás de arraste: Hélio
- Pressão na coluna: 2,2 kPa
- Velocidade Linear: 46 cm s⁻¹
- Fluxo Total: 16,8 mL min⁻¹
- Fluxo na coluna: 0,8 mL min⁻¹
- Modo ionização: impacto eletrônico (70 eV)
- Modo aquisição: SIM
- *Solvent cut time*: 5 minutos
- Voltagem detector: 2,0 kV

3.5.5 Procedimento de extração para amostras de plasma

Em um frasco de vidro transparente para SPME de 20 mL contendo a amostra de plasma fortificado foram adicionados 10 mL de solução ácido fórmico 0,5 mol L⁻¹ pH = 3,0;

100 µL do agente pareador iônico TBA-Br 0,1 mol L⁻¹ e 50 µL do reagente derivatizante dietil sulfato. O frasco foi fechado com lacre de alumínio e septo de silicone, e submetido à agitação magnética durante 5 minutos à 55°C a fim de homogeneizar a amostra e garantir que os analitos fossem derivatizados. Em seguida, a fibra de PDMS/DVB foi exposta diretamente na amostra durante 45 minutos à 55°C, sob agitação para que os analitos fossem extraídos da amostra para a fase extratora. A dessorção dos analitos foi realizada introduzindo a fibra de SPME no injetor do cromatógrafo a gás durante 15 minutos a 260°C.

3.5.6 Otimização das condições de extração por SPME

A SPME associada à derivatização *in situ* possui inúmeras variáveis que influenciam no seu desempenho. Dessa maneira, foi necessário avaliar os principais parâmetros e otimizá-los.

Primeiramente foi empregado um planejamento fatorial fracionado (2^{5-2}) com o objetivo de otimizar a etapa de extração variando-se o pH (3,0 e 10,0), tempo de extração (10 e 60 minutos), temperatura (25°C e 85°C), força iônica (0 e 30% de NaCl) e volume de solução tampão (4 e 10 mL). Incluiu-se nesta etapa um ponto central onde as variáveis estavam no valor médio a fim de estimar o erro experimental sem a necessidade de replicata do planejamento. O software Statística 7.0 foi utilizado para construção do modelo e este foi avaliado por ANOVA (Análise de variância). A Tabela 6 demonstra o esquema de planejamento realizado.

Tabela 6 – Planejamento fatorial fracionado 2^{5-2} utilizado para otimizar as condições de extração.

Variáveis	Nível Baixo	Ponto Central	Nível alto
Tempo	10 min	35 min	60 min
pH	3,0	6,5	10,0
Temperatura	25°C	55 °C	85°C
Adição sal	0%	15%	30%
Volume tampão	4 mL	7 mL	10 mL

Experimento	Tempo	pH	Temperatura	Sal	Volume tampão
1	-	-	-	+	+
2	+	-	-	-	-
3	-	+	-	-	+
4	+	+	-	+	-
5	-	-	+	+	-
6	+	-	+	-	+
7	-	+	+	-	-
8	+	+	+	+	+
9	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0

Após a otimização da extração, foi realizada a otimização do processo de derivatização empregando um planejamento fatorial completo (2^3) variando-se o pH (3,0 e 10,0), volume de agente pareador iônico (30 e 100 μL) e volume de reagente derivatizante (10 e 50 μL) também utilizando a adição de pontos centrais. A Tabela 7 demonstra o esquema de planejamento realizado.

Com base nas variáveis significativas indicadas pelo gráfico de Pareto, foi aplicado um planejamento composto central, no qual foram realizados nove ensaios, sendo o ponto central em triplicata. Essas réplicas no ponto central têm como finalidade verificar a variância da resposta prevista e fornecer uma medida do erro puro. O número total de experimentos foi determinado pela expressão: $2^k + 2k + 1$. Nesse planejamento as variáveis avaliadas foram temperatura de extração (25°C, 33,73°C, 55°C, 76,27°C e 85°C) e volume de agente derivatizante (10 μL ; 15,82 μL ; 30 μL ; 44,18 μL e 50 μL). A Tabela 7 mostra o esquema do planejamento fatorial completo e a Tabela 8 o planejamento composto central.

Tabela 7 – Planejamento fatorial completo 2³ utilizado para otimizar as condições de derivatização.

Variáveis	Nível Baixo	Ponto Central	Nível alto
pH	3,0	6,5	10,0
Volume DES	10 µL	30 µL	50 µL
Volume TBA-Br	30 µL	65 µL	100 µL

Experimento	pH	Vol. DES	Vol. TBA-Br
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Tabela 8 – Planejamento composto central utilizado para otimizar as condições de extração e derivatização.

Variáveis	- α	-1	0	1	α
Temperatura	25°C	33,73°C	55°C	76,27°C	85°C
Volume DES	10 µL	15,82 µL	30 µL	44,18 µL	50 µL

Experimento	Temperatura	Volume DES
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	- α	0
6	α	0
7	0	- α
8	0	α
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Definidas as condições ótimas para a derivatização e extração dos analitos foi realizado uma otimização univariada com objetivo de fixar o tempo necessário para extração das estatinas na fibra de SPME. Assim, estabeleceu-se um compromisso entre as condições ótimas definidas previamente e utilizou-se os valores de 15, 30, 45 e 60 minutos para avaliar o efeito do tempo de extração no método desenvolvido.

Deve-se lembrar que, antes de cada extração a fibra era lavada em uma solução contendo metanol e água durante 10 minutos para evitar o efeito de memória e aumentar o tempo de vida útil da fibra de SPME.

3.5.7 Validação

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (RIBANI et al., 2004).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), recomenda a avaliação dos seguintes parâmetros de validação analítica: seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limite de quantificação (LOQ), limite detecção (LOD) e recuperação, bem como estabelece os limites de tolerância, garantindo assim que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. A ANVISA também determina que a validação de todos os métodos bioanalíticos, envolvendo métodos cromatográficos de análise, seja realizada empregando o método do padrão interno.

A validação dos métodos analíticos para análises de fármacos em fluidos biológicos deve ser realizada utilizando-se amostras biológicas de referência, enriquecidas com os analitos em diferentes concentrações (considerando o intervalo terapêutico).

3.5.7.1 Seletividade

A seletividade e/ou especificidade de um método analítico é um importante parâmetro a ser avaliado para garantir que a quantificação do analito de interesse não seja afetada pela presença de metabólitos, produtos de degradação, fármacos co-administrados ou compostos endógenos (CASSIANO et al., 2009).

Assim, a seletividade do método foi avaliada por meio da análise de três amostras diferentes de plasma branco. Foi analisada a presença de interferentes eluindo no mesmo tempo de retenção dos fármacos em estudo. Brancos da fibra e da coluna cromatográfica utilizada foram realizados periodicamente para verificação de possíveis contaminações durante o procedimento analítico.

3.5.7.2 Linearidade

A linearidade é a resposta obtida em função da concentração do analito, a qual deve ser estudada em um intervalo de concentração apropriado. Na prática, a linearidade é determinada por intermédio de gráficos de calibração, também denominados curva de calibração, que corresponde a um gráfico onde o eixo x relaciona as concentrações preparadas do padrão analítico da substância de interesse, e o eixo y o sinal analítico obtido para cada concentração do padrão (LANÇAS, 2006).

Dessa maneira, a linearidade foi verificada analisando-se amostras de plasma fortificadas em seis níveis de concentrações (Tabela 9), com três replicatas em cada ponto e utilizando ibuprofeno deuterado na concentração de 500 ng mL⁻¹ como padrão interno. O coeficiente de correlação (r^2) e a equação linear de regressão foram calculados pelo método dos mínimos quadrados e o coeficiente angular (b) e linear (a) foram obtidos em função da equação da reta ($y = ax + b$).

Neste caso, não foi possível avaliar os parâmetros de validação analítica para a atorvastatina devido à dificuldade encontrada em baixar seus níveis de concentração. Isto pode ser explicado pelo fato da atorvastatina ser menos extraída pela fibra de PDMS-DVB, que extrai os compostos por absorção e adsorção. A adsorção auxilia na extração de compostos polares, porém é um processo competitivo em que uma molécula com maior afinidade pela fase extratora desloca uma molécula com menor afinidade. Além disso, deve-se considerar também a baixa ionização do fármaco no sistema GC-MS utilizado.

Tabela 9 - Valores das concentrações utilizadas na avaliação da linearidade.

Compostos	Concentração (ng mL ⁻¹)					
	20	50	100	250	350	500
Fluvastatina	20	50	100	250	350	500
Simvastatina	50	150	200	300	400	500

3.5.7.3 Precisão

A precisão pode ser expressa como uma estimativa do desvio padrão (s) ou desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV%), de uma série de repetições da mesma amostra, em diferentes preparações:

$$s = \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$$

$$\text{DPR (\%)} \text{ ou } \text{CV (\%)} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

onde x_i é o valor individual de uma determinação, \bar{x} é a média aritmética das determinações e N é o número de determinações. A precisão pode ser avaliada de três maneiras: através da repetibilidade (precisão intra-dia); precisão intermediária (precisão inter-dias) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) (CASSIANO et al., 2009).

Nesse caso, a precisão intra-dia ($n = 5$) foi avaliada em três níveis de concentração (Tabela 10) e a precisão inter-dia ($n = 3$) foi verificada nas mesmas concentrações por meio de análises realizadas em dois dias diferentes. A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR%).

Tabela 10 - Valores de concentração usados para avaliação da precisão intra e inter-dia.

Compostos	Concentração (ng mL⁻¹)		
Fluvastatina	20	250	500
Simvastatina	50	300	500

3.5.7.4 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

O Limite de Detecção (LOD) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado como um valor exato. O LOD pode ser calculado pela relação sinal-ruído que deve ser de 3:1, proporção geralmente aceita como estimativa do limite de detecção. Já o Limite de Quantificação (LOQ), corresponde à menor

quantidade de um analito que pode ser quantificado com exatidão e precisão determinada. Os mesmos critérios de LOD podem ser adotados para o LOQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LOQ também pode ser calculado utilizando a relação sinal-ruído (LANÇAS, 2006; RIBANI et al., 2004).

3.5.7.5 Recuperação

A recuperação avalia a eficiência do método de tratamento das amostras biológicas. Este parâmetro é calculado comparando-se a resposta obtida para o analito adicionado na matriz biológica e extraído, com a resposta obtida para o analito em amostras preparadas em solvente e, conseqüentemente, não extraídas, as quais representam 100% (CASSIANO et al., 2009).

Para a avaliação da recuperação deve-se utilizar concentrações em três níveis: baixo, médio e alto, de acordo com a curva de calibração. Embora altos valores de recuperação sejam desejáveis para maximizar a sensibilidade do método, não é necessário que este valor seja de 100% e, sim, que a recuperação seja consistente, precisa e reprodutiva (CASSIANO et al., 2009).

A recuperação pode ser dividida em absoluta e relativa. A recuperação absoluta é medida como a razão entre a quantidade de analito extraído pelo método proposto e a quantidade de analito presente em uma solução a qual não foi submetida ao processo de extração. Por outro lado, a recuperação relativa compara a quantidade de analito extraído de uma amostra contendo a matriz e a quantidade extraída de uma solução simples que contém o analito. Esse tipo de recuperação pode ser obtido pela razão entre a resposta da extração de um determinado analito fortificado em plasma e a resposta da extração da mesma concentração do analito fortificada em água.

A recuperação das estatinas foi avaliada em três diferentes níveis de concentração (Tabela 11). A recuperação relativa foi calculada da seguinte forma:

$$R = [(A_{am} / A_{ISm}) / (A_{ar} / A_{ISr})] \times 100$$

Onde,

A_{am} = área do analito na amostra enriquecida

A_{ISm} = área do padrão interno na amostra enriquecida

A_{ar} = área do analito no padrão de referência

A_{ISr} = área do padrão interno no padrão de referência

Tabela 11 - Valores de concentração usados para avaliação da recuperação.

Compostos	Concentração (ng mL ⁻¹)		
Fluvastatina	20	250	500
Simvastatina	50	300	500

4

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração, separação e identificação das estatinas utilizando SPME-GC-MS

Inicialmente, a etapa de extração foi testada utilizando uma fibra de SPME de CW-DVB 65 μm existente no laboratório; adicionou-se em um frasco transparente de vidro para SPME 10 mL de água Milli-Q; 1 mL de solução tampão ácido acético/acetato de amônio 0,5 mol L⁻¹ pH = 4,5; 60 μL do agente pareador iônico TBA-HSO₄ 0,1 mol L⁻¹ e 15 μL do reagente derivatizante dimetil sulfato (DMS). Soluções padrões contendo simvastatina, fluvastatina e atorvastatina em etanol foram adicionadas ao frasco a fim de obter a concentração de 1 mg L⁻¹. O frasco foi fechado com lacre de alumínio e este foi submetido à agitação magnética durante 5 minutos a fim de homogeneizar a amostra e garantir que os analitos fossem derivatizados. Em seguida, a fibra foi exposta diretamente na amostra durante 45 minutos sob agitação para que os analitos fossem extraídos da fase aquosa para a fase extratora. Logo após essa etapa, a fibra foi retirada do frasco de amostragem e inserida no injetor do cromatógrafo gasoso durante 15 minutos à 260°C a fim de dessorver os analitos da fase extratora da fibra de SPME. Esta análise foi realizada em um GC-MS QP5000 utilizando uma coluna Rxi®-35SILMS (L = 30 m; d_f = 0,25 μm e d_i = 0,25 mm) da Restek® e programação de temperatura do forno iniciando a 80°C durante 2 minutos, aumentando 30°C/min até 280°C e mantendo esta temperatura durante 22 minutos.

Nas Figuras 10 a 12 encontram-se os cromatogramas e os espectros de massas dos analitos em estudo.

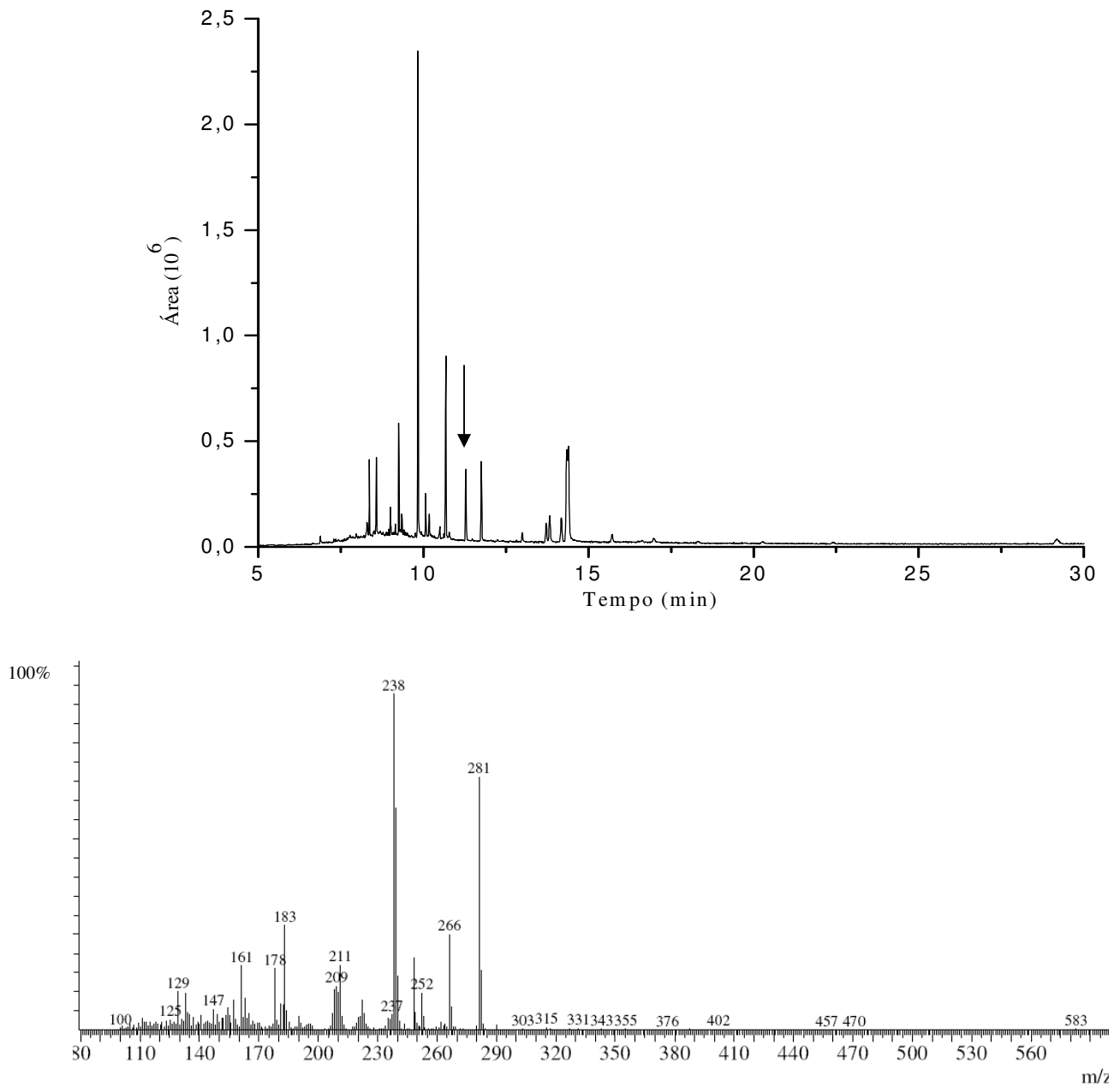


Figura 10 – Cromatograma de íons totais (TIC) no modo full *SCAN* e espectro de massas no modo EI da amostra fortificada com 1000 ng mL⁻¹ de fluvastatina usando fibra de CW-DVB para extração SPME com derivatização *in situ*. A seta indica o pico correspondente no tempo de retenção do analito em estudo.

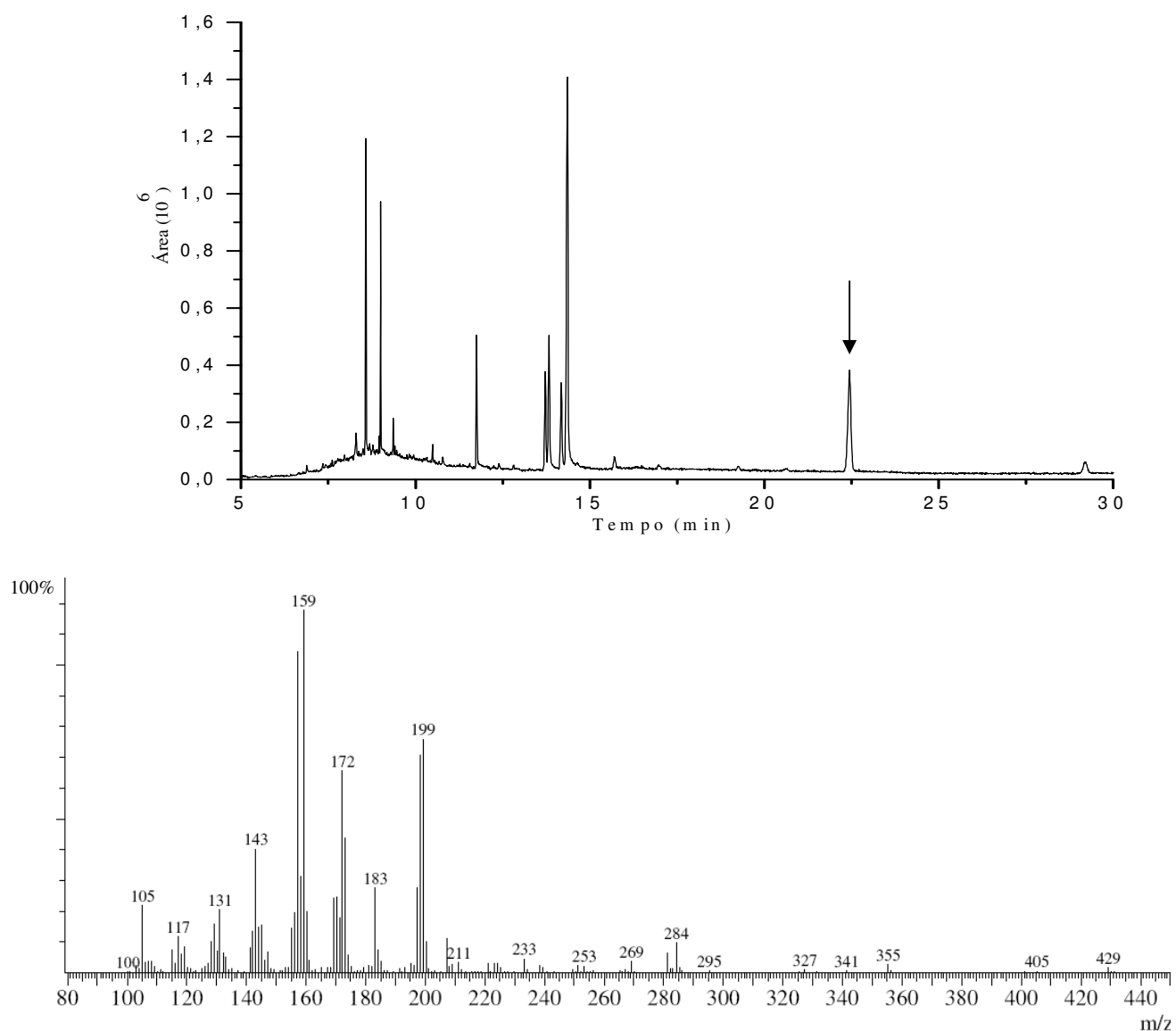


Figura 11 – Cromatograma de íons totais (TIC) no modo full SCAN e espectro de massas no modo EI da amostra fortificada com 1000 ng mL^{-1} de simvastatina usando fibra de CW-DVB para extração SPME com derivatização *in situ*. A seta indica o pico correspondente no tempo de retenção do analito em estudo.

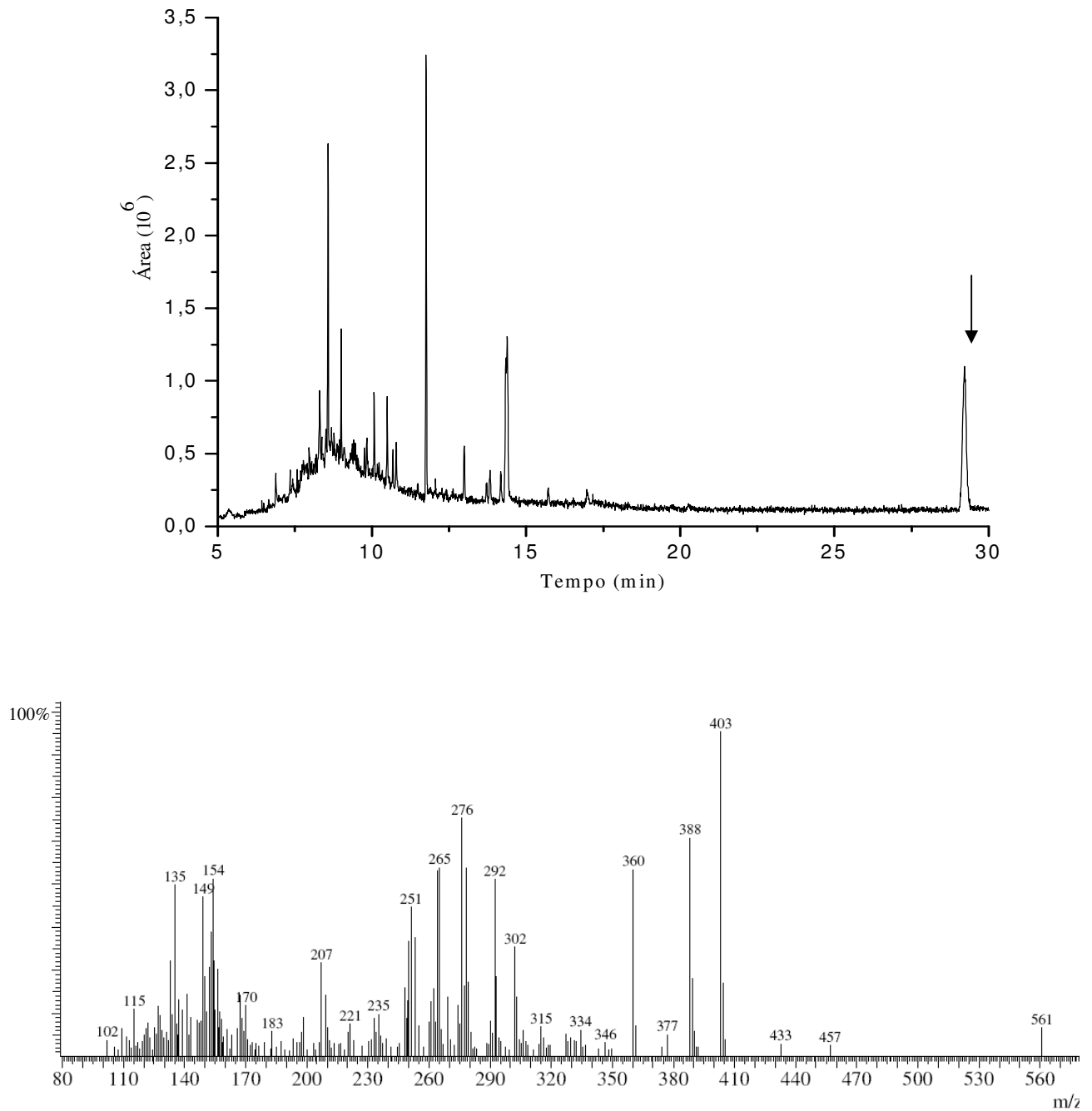


Figura 12 – Cromatograma de íons totais (TIC) no modo full *SCAN* e espectro de massas no modo EI da amostra fortificada com 1000 ng mL⁻¹ de atorvastatina usando fibra de CW-DVB para extração SPME com derivatização *in situ*. A seta indica o pico correspondente no tempo de retenção do analito em estudo.

A análise dos cromatogramas mostra picos bem separados e com boa resolução para as estatinas em estudo, sendo o tempo de retenção de 10,67 minutos para a fluvastatina; 22,44 minutos para a simvastatina e 29,22 minutos para a atorvastatina nas condições cromatográficas estabelecidas. A identificação dos analitos foi feita através do monitoramento dos íons característicos para cada composto na forma derivatizada, sendo os íons principais de m/z 183, 211, 238, 266 e 281 para a fluvastatina, m/z 157, 159, 172, 198 e 199 para a simvastatina e m/z 276, 292, 360, 388 e 403 para a atorvastatina.

4.2 Seleção da fase extratora da fibra de SPME

Confirmado o perfil cromatográfico e espectrométrico das estatinas, foi necessário realizar a seleção da fase extratora mais apropriada para extração desses analitos. No entanto, para obtenção de bons resultados foi considerado a polaridade dos analitos e as propriedades químicas e físicas da fase extratora, pois estes são parâmetros importantes no processo de equilíbrio de partição.

Para seleção da melhor fase extratora, foram realizados testes qualitativos com algumas fibras de SPME disponíveis no laboratório, tais como PDMS, PDMS/DVB e PA a fim de avaliar quais destas fibras apresentariam um melhor desempenho para a extração das estatinas. Porém, para essa etapa utilizou-se como reagente derivatizante o dietil sulfato (DES), pois além de encontrar-se disponível no laboratório em maior quantidade, apresenta a mesma função de reagente alquilante que o dimetil sulfato (DMS), podendo assim ser facilmente substituído. A etapa de extração foi realizada utilizando as mesmas condições anteriores, exceto pelo uso do dietil sulfato (DES) como reagente derivatizante. A Figura 13 ilustra em gráfico as áreas dos picos cromatográficos obtidos para extração das estatinas em fibras de SPME com diferentes fases extradoras.

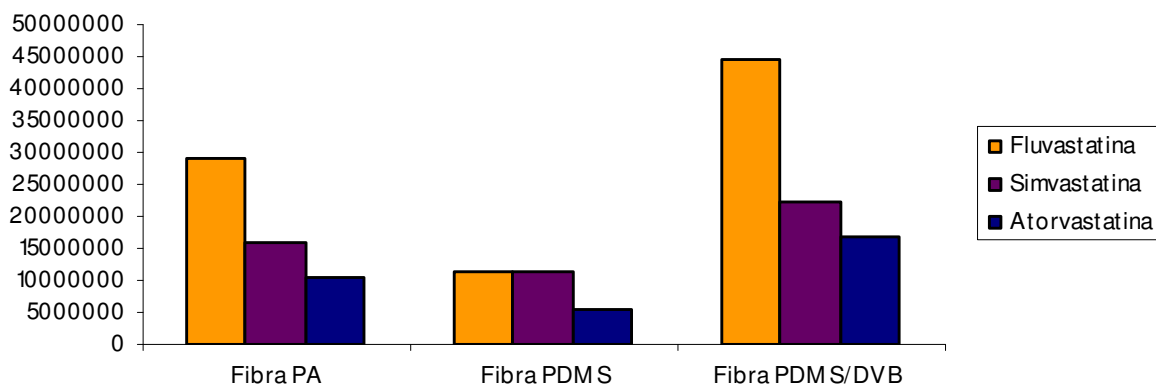


Figura 13 - Comparação entre as áreas dos cromatogramas obtidos por SPME-GC-MS para fluvastatina, simvastatina e atorvastatina em diferentes fases extratoras.

Dentre as fibras de SPME testadas para extração das estatinas, a fibra de PDMS/DVB apresentou melhor desempenho quando comparada com outros recobrimentos. Isto pode ser explicado pelo princípio “semelhante dissolve semelhante”. Considerando que as estatinas são compostos que apresentam tanto grupamentos polares como não-polares, os recobrimentos de PA (fase polar) e PDMS (fase não-polar) não proporcionam uma performance tão boa para a extração destes fármacos quando comparados com PDMS/DVB, que são recobrimentos mistos com polaridade modificada através da inserção de grupos divinilbenzeno.

4.3 Desenvolvimento da metodologia SPME-GC-MS

Selecionada a fase extratora da fibra de SPME foi testado o uso de uma solução de ácido fórmico $\text{pH} = 3,0$ na etapa de extração das estatinas. Este procedimento foi realizado para garantir que a maior parte das moléculas presentes na matriz estivesse na forma neutra (não ionizada), pois em SPME somente a forma não-ionizada é extraída pela fase extratora. Dessa forma foi observado um aumento na quantidade de analito extraído para fluvastatina e atorvastatina, que são espécies ionizáveis de caráter ácido apresentando pK_a em torno de 4,5.

Esse aumento ocorre, pois quando o pH do meio é igual ao pKa das moléculas em estudo, estas estão 50% na forma ionizada e 50% na forma não ionizada em meio aquoso. Porém, se o pH do meio estiver em torno de duas unidades abaixo do pKa da molécula, estas estarão 99% na forma não ionizada, favorecendo assim a extração dos analitos.

Como os recobrimentos disponíveis em SPME abrangem uma faixa de pH entre 2,0 e 11,0, não sendo possível usar valores de pH extremos (menor que 2,0 e maior que 11,0), tomou-se o devido cuidado ao baixar o pH, a fim de evitar possíveis danos na fase extratora da fibra.

Sendo assim, visando preservar a fibra de PDMS/DVB substituiu-se o agente pareador iônico tetrabutylamônio hidrogeno sulfato (TBA-HSO₄) pelo brometo de tetrabutylamônio (TBA-Br) na etapa de derivatização, pois o TBA-HSO₄ apresenta caráter muito ácido, podendo deteriorar a fibra de SPME. O TBA-Br se mostrou eficiente na extração das estatinas, apresentando os mesmos resultados quando comparado com TBA-HSO₄, porém protegendo a fibra de possíveis danos relacionados ao uso em pHs inapropriados.

A separação cromatográfica também foi otimizada fim de se obter um tempo de análise menor e boa resolução cromatográfica. Para isto realizou-se uma programação de temperatura do forno do GC. Esta programação foi realizada utilizando uma coluna Rtx®5MS (L = 15 m; df = 0,25 µm e di = 0,25 mm) da Restek® com a temperatura do forno iniciando a 80°C durante 2 minutos, aumentando 30°C/min até 300°C e mantendo esta temperatura durante 12 minutos.

A Tabela 12 contém algumas propriedades químicas das estatinas, o tempo de retenção obtido através dos cromatogramas e os íons selecionados de acordo com a verificação dos espectros de massas.

Tabela 12 - Coeficientes de partição octanol-água ($\log K_{o/w}$), constante de acidez (pKa), íons selecionados (m/z) e respectivos tempos de retenção (t_R) de cada analito.

Analito	$\log K_{o/w}$	pKa	t_R (min)	m/z
Fluvastatina	4,85	4,60	8,50	183, 211, 238, 266, 281
Simvastatina	4,68	13,5	11,22	157, 159, 172, 198, 199
Atorvastatina	6,36	4,46	11,76	276, 292, 360, 388, 403

4.4 Otimização das condições de extração por SPME

4.4.1 Planejamento fatorial fracionado (2^{5-2})

A Figura 14 apresenta o diagrama de Pareto sendo possível observar a importância de cada variável estudada, bem como suas interações, para a extração da fluvastatina, tendo como resposta a área do cromatograma. Observa-se que fatores como a temperatura, tempo e força iônica são significativos neste caso, pois a linha pontilhada indica a região acima da qual os efeitos foram significativos com limite de confiança de 95%.

As variáveis tempo e temperatura atuam de modo positivo na extração deste fármaco, ou seja, o aumento do tempo e da temperatura produz um aumento na quantidade extraída. Este resultado está de acordo com a literatura, pois a SPME é uma técnica baseada na partição dos analitos entre duas fases, sendo necessário um tempo adequado para se atingir o equilíbrio. Já a temperatura pode agir de dois modos durante a extração; aumentando a difusão do analito e como consequência aumentando a extração, ou diminuindo o coeficiente de partição entre a fase aquosa e a fase extratora, e, portanto, diminuindo a extração. Nesse caso, o efeito relacionado à difusão do analito apresentou maior importância.

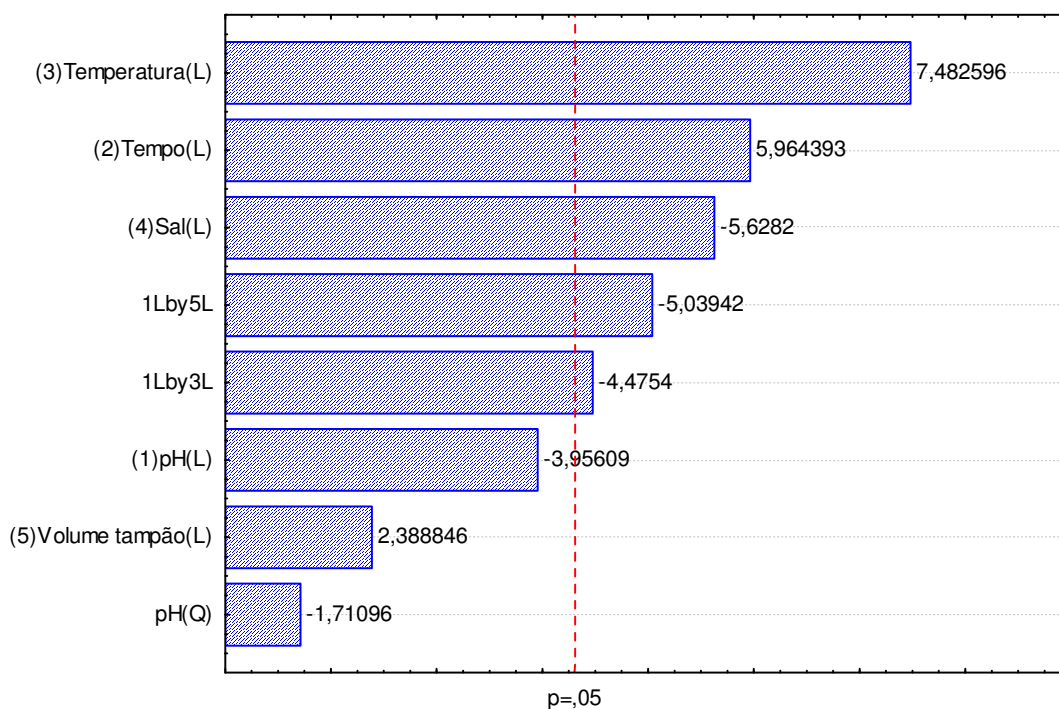


Figura 14 - Diagrama de Pareto do planejamento fatorial fracionado 2^{5-2} representando a extração da fluvastatina.

Por sua vez, a força iônica apresentou um efeito negativo, diminuindo a quantidade de analito extraído à medida que uma quantidade de sal era adicionada à solução. Assim, essa variável foi retirada do estudo, já que o nível mínimo de NaCl utilizado foi 0%.

O pH também apresentou efeito negativo na extração da fluvastatina, apesar de não ser uma variável significativa. Quando pH = 3,0 foi utilizado, a extração foi maior do que quando pH = 10,0 foi usado, pois a fluvastatina é um ácido fraco apresentando pKa em torno de 4,6; e portanto está completamente não ionizado em pH = 3,0; favorecendo a extração pela fibra de SPME.

A Figura 15 apresenta o diagrama de Pareto para a extração da atorvastatina. Nesse caso, observa-se que nenhum dos fatores estudados foram significativos para a extração desse fármaco. As variáveis tempo, temperatura e volume de tampão também atuam de modo positivo na extração, e as variáveis pH e força iônica atuam de modo negativo, seguindo o mesmo perfil de interações para a extração da fluvastatina.

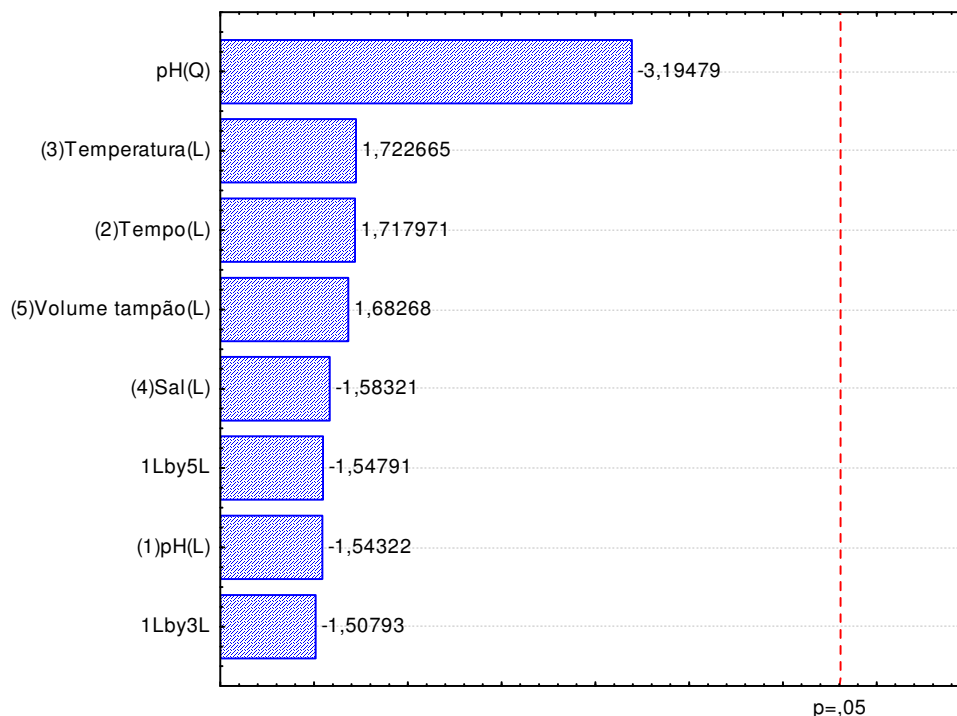


Figura 15 - Diagrama de Pareto do planejamento fatorial fracionado 2^{5-2} representando a extração da atorvastatina.

A Figura 16 apresenta o diagrama de Pareto para a extração da simvastatina. Observa-se que para este fármaco todos os fatores foram significativos. As variáveis tempo, temperatura e volume de tampão atuam de modo positivo na extração, e as variáveis pH e força iônica atuam de modo negativo, assim como para os outros fármacos.

O planejamento fatorial fracionário mostrou resultados diferentes para cada composto estudado. Porém, com base nesses resultados, foi possível verificar que ao aumentar o tempo, a temperatura e o volume de tampão, aumenta a quantidade extraída dos fármacos. Por outro lado, quanto menor a quantidade de sal adicionado à solução, melhor a extração dos compostos, pois à medida que a concentração de sal aumenta, este interage com os analitos em solução através de interações eletrostáticas, reduzindo a capacidade do analito de migrar para a fase extratora.

O pH, por sua vez, também atua de forma negativa na extração dos fármacos, isto é, quanto menor o pH da solução, maior a extração pela fase extratora da fibra.

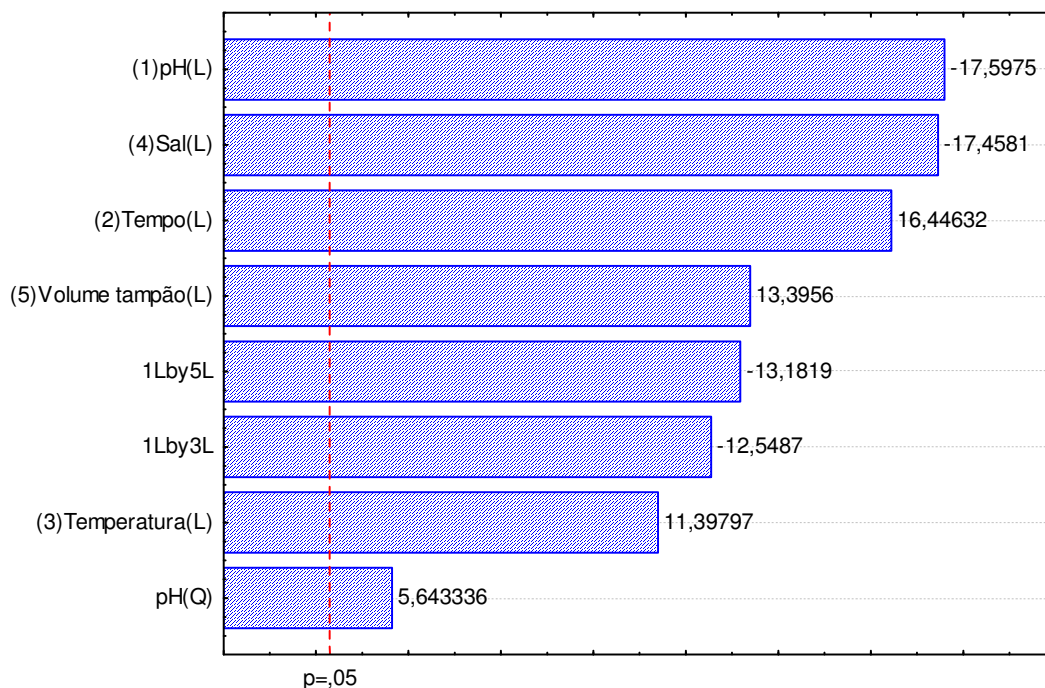


Figura 16 - Diagrama de Pareto do planejamento fatorial fracionado 2^{5-2} para extração da simvastatina.

Diante desses resultados, otimizou-se a extração SPME das estatinas de modo a utilizar as melhores condições para os três fármacos: 10 mL de solução tampão com pH = 3,0 sem adição de NaCl.

4.4.2 Planejamento fatorial completo (2^3)

A Figura 17 representa o diagrama de Pareto para a etapa de derivatização da fluvastatina e atorvastatina. Como os resultados obtidos para estes fármacos apresentam o mesmo perfil de interações, apenas o diagrama da fluvastatina será apresentado com intuito de verificar a influência de cada variável na etapa de derivatização. Por meio deste diagrama é possível observar que os três fatores estudados foram significativos.

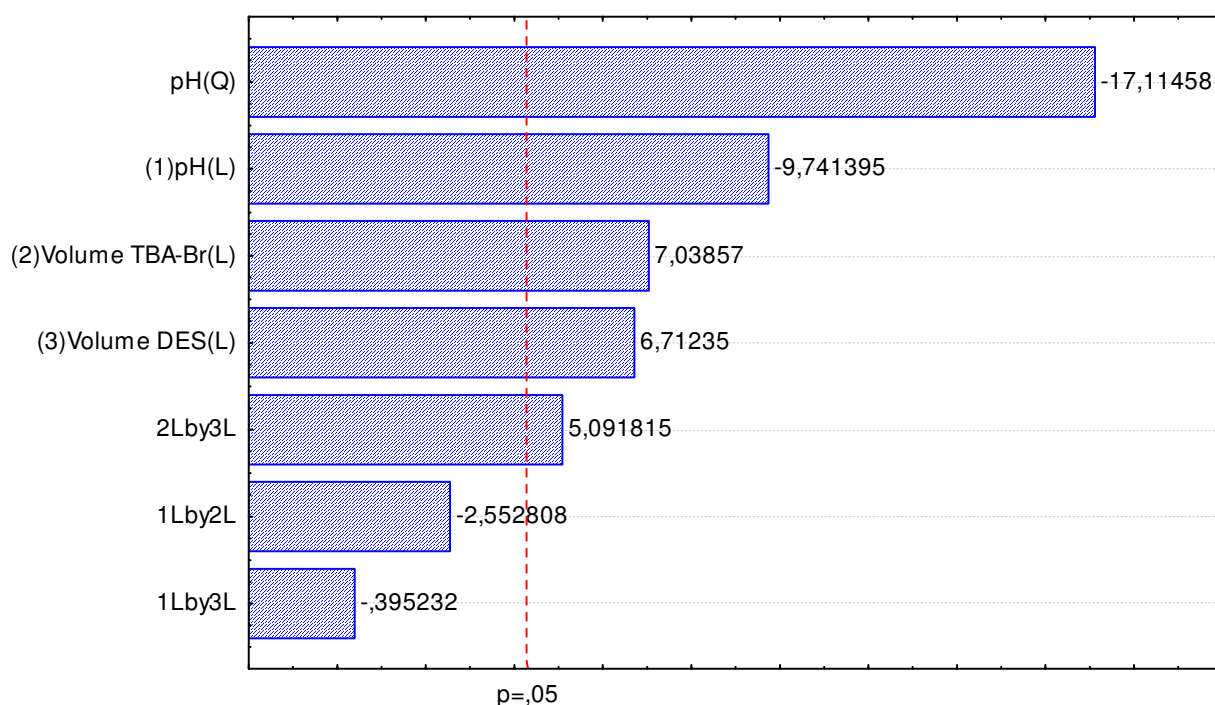


Figura 17 - Diagrama de Pareto do planejamento fatorial completo 2^3 representando a derivatização da fluvastatina.

A variável pH atua de modo negativo na derivatização desses fármacos, de maneira que o uso de pH = 3,0 favorece a reação de derivatização. Já as variáveis volume de TBA-Br e volume de dietil sulfato atuam de modo positivo, de forma que o aumento desses volumes, aumenta a quantidade de fármacos derivatizados.

Neste caso, não foi necessário realizar a otimização da etapa de derivatização para a simvastatina, pois dentre os fármacos estudados, este é o único composto que se apresenta na forma de lactona, sendo assim, pode ser extraído por SPME e analisado por cromatografia gasosa sem etapa a de derivatização.

Analisando os resultados obtidos desta etapa do planejamento experimental foi otimizada a derivatização da fluvastatina e atorvastatina de modo a utilizar as melhores condições para estes fármacos: 100 μ L do reagente pareador iônico TBA-Br e pH da amostra igual a 3,0.

Como os modelos obtidos para os fármacos em estudo estavam de acordo entre si e apresentaram coeficientes de correlação adequados e falta de ajuste não significativa, as variáveis volume de reagente derivatizante e temperatura foram selecionadas para o planejamento composto central.

4.4.3 Planejamento Composto Central (CCD)

A elaboração do planejamento composto central permitiu estudar 2 variáveis em 5 níveis diferentes (Figura 18). Os valores codificados e os valores reais para cada variável podem ser observados na Tabela 8, na qual os valores +1 e -1 são referentes aos níveis máximos e mínimos, respectivamente. Os valores +1,41 e -1,41 referem-se aos pontos axiais, e o ponto 0 (zero) corresponde ao ponto central do planejamento.

Para realização desta etapa do processo de otimização utilizou-se as condições ótimas de extração e derivatização previamente estabelecidas para os fármacos em estudo: 10 mL de solução tampão pH = 3,0 e 100 μ L de solução de TBA-Br 0,1M.

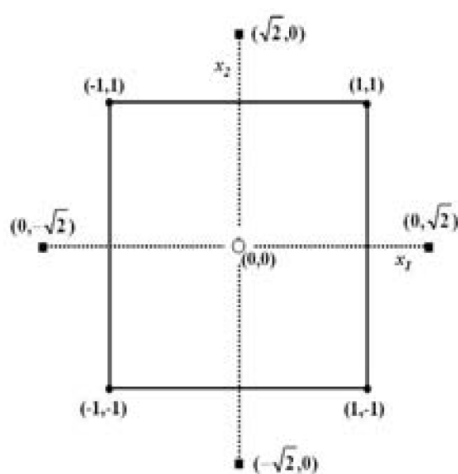


Figura 18 - Esquema representativo do planejamento composto central com $k = 2$ e $\alpha = 1,414$.

A metodologia de superfície de resposta fornece o ponto ótimo em torno da região experimental disponível. A Figura 19 ilustra a média dos resultados para a superfície de resposta considerando os modelos para os três analitos, que apresentaram coeficiente de correlação adequado e falta de ajuste não-significativo.

A partir da análise desse gráfico foi possível estimar o ponto ótimo fixado em 50 μ L de reagente derivatizante e temperatura de extração à 55°C. O gráfico de superfície de resposta mostra que as duas variáveis estudadas, volume de reagente derivatizante e temperatura, atuam de forma positiva na extração dos fármacos, ou seja, à medida que a temperatura e o volume de reagente derivatizante são aumentados, a extração dos compostos em estudo é favorecida. Porém, quando aumenta-se muito a temperatura de extração, diminui-se o coeficiente de partição dos analitos entre o revestimento da fibra e a matriz, havendo uma diminuição da quantidade de analitos extraídos. Dessa maneira, optou-se por realizar a extração à 55°C ao invés de 85°C, pois não foi perceptível uma mudança na quantidade de analito extraído quando aumentava a temperatura acima de 55°C.

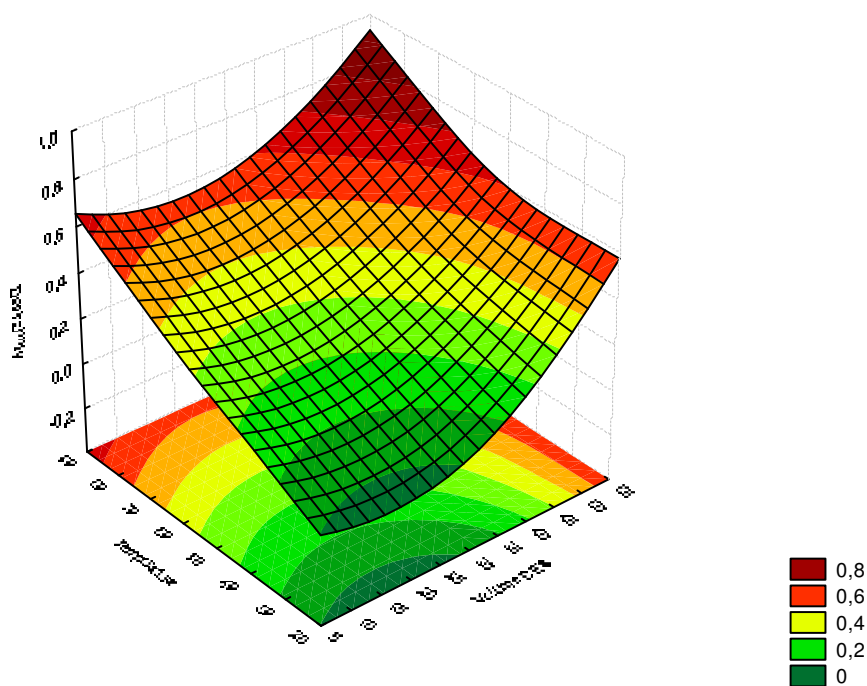


Figura 19 – Gráfico de superfície de resposta através do planejamento composto central para fluvastatina, simvastatina e atorvastatina.

4.4.4 Otimização univariada

Estabelecidas as condições ótimas de derivatização e extração, objetivando uma determinação eficiente das estatinas, foi necessário avaliar o tempo de extração utilizando uma otimização univariada. Assim, fixou-se as seguintes condições: 10 mL de solução ácido fórmico 0,5 mol L⁻¹ pH = 3,0; 100 µL do agente pareador iônico TBA-Br 0,1 mol L⁻¹; 50 µL do reagente derivatizante e temperatura de extração à 55°C.

A Figura 20 mostra a curva cinética para o tempo de extração das três estatinas estudadas nas condições otimizadas. Nota-se que no tempo de 60 minutos o equilíbrio foi atingido para estes compostos. Porém, escolheu-se o tempo de 45 minutos já obteve uma boa resposta para a quantidade extraída dos compostos em estudo.

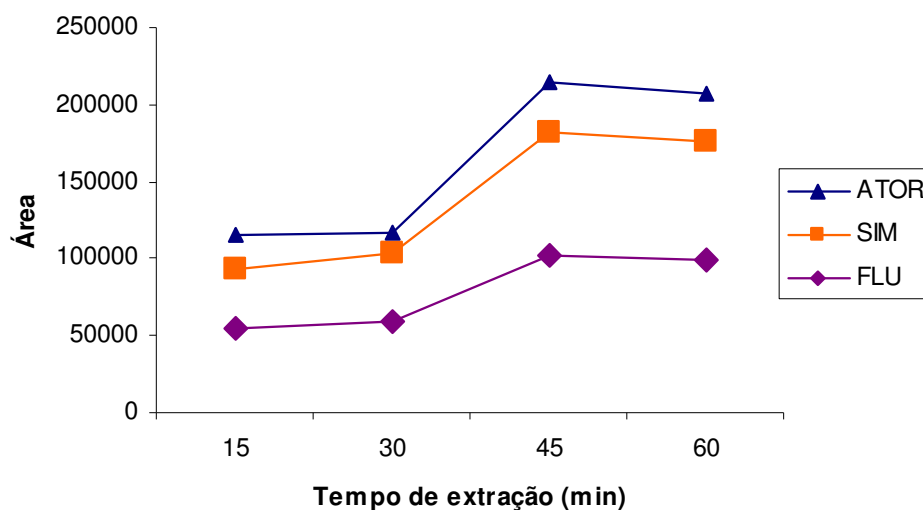


Figura 20 - Curva cinética da extração SPME para as estatinas estudadas.

4.5 Validação

A validação do método analítico desenvolvido foi realizada seguindo a Resolução n° 899 de 29/05/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Os parâmetros de validação selecionados foram: seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e recuperação (BRASIL, 2003).

Nas análises realizadas por GC-MS foram monitorados cinco íons para cada composto, sendo um íon utilizado para a quantificação e os demais para confirmação dos analitos.

4.5.1 Seletividade

O método desenvolvido se mostrou seletivo, pois nenhum pico eluiu no mesmo tempo de retenção da fluvastatina, simvastatina ou ibuprofeno quando amostras de plasma branco de referência foram analisadas (Figura 21 e 22).

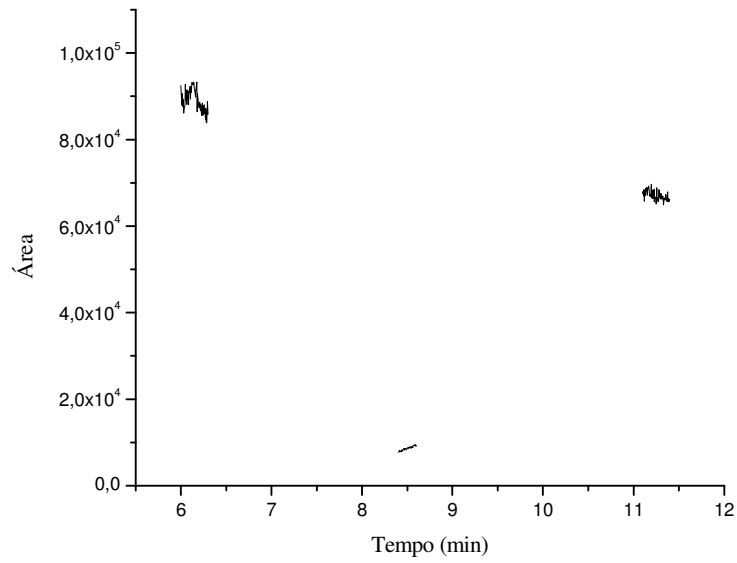


Figura 21 - Cromatograma obtido no modo SIM do plasma branco de referência utilizando o método SPME-GC-MS.

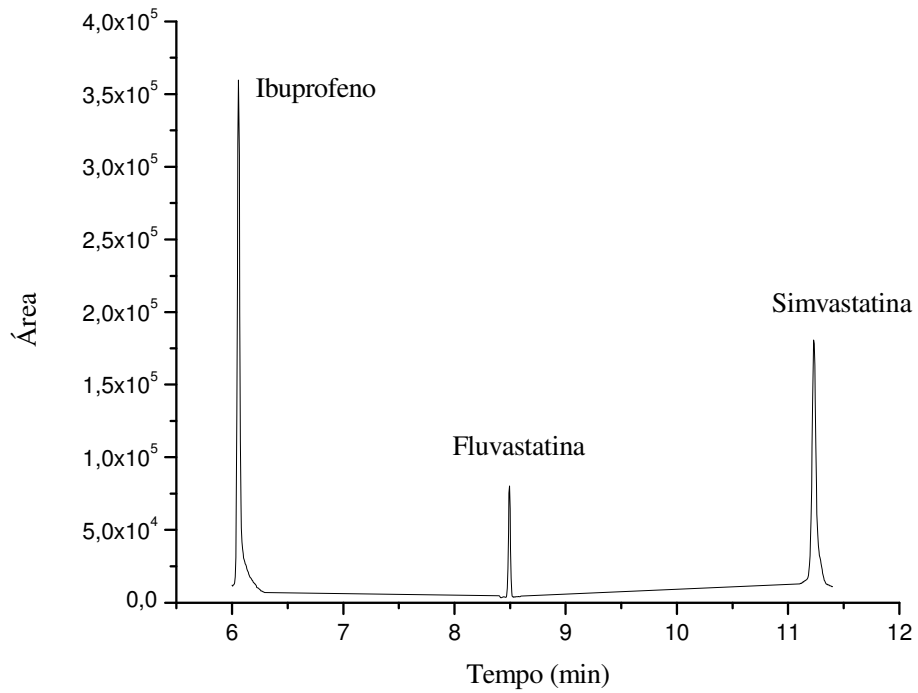


Figura 22 - Cromatograma obtido no modo SIM da amostra de plasma fortificada com estatinas e ibuprofeno deuterado como padrão interno na concentração de 1000 ng mL^{-1} .

4.5.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através de amostras de plasma de referência, enriquecidas com fluvastatina e simvastatina. A faixa de concentração plasmática estudada foi de 20 a 500 ng mL⁻¹ para a fluvastatina e de 50 a 500 ng mL⁻¹ para a simvastatina.

Os resultados do estudo de linearidade, como a faixa de linear avaliada, as equações da reta e os coeficientes de correlação (r^2) obtidos estão apresentados na Tabela 13. Os coeficientes de correlação foram maiores que 0,98 demonstrando haver uma correlação entre concentração e resposta obtida (Figura 23 e 24).

Tabela 13 - Resultados da linearidade para os fármacos estudados.

Compostos	Intervalo linear (ng mL ⁻¹)	Equação da reta ($y = ax+b$)	r^2
Fluvastatina	20 a 500	$y = 0,0002x + 0,0047$	0,9865
Simvastatina	50 a 500	$y = 0,0004x - 0,0002$	0,9952

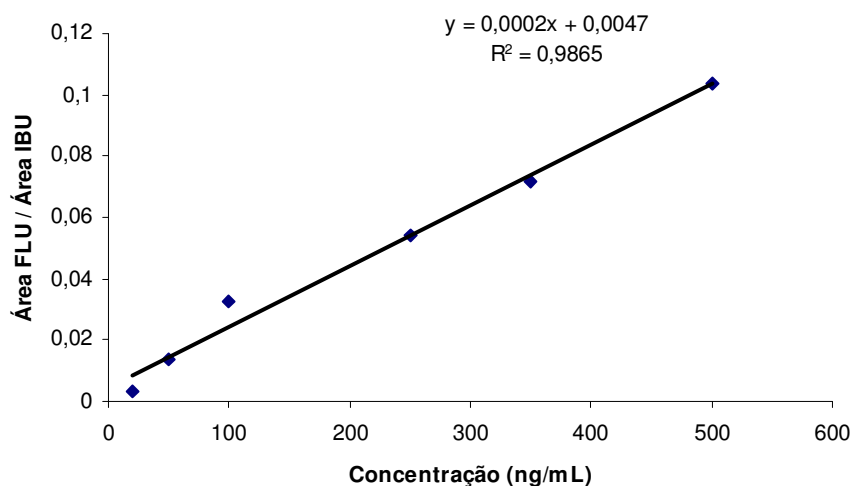


Figura 23 - Curva de calibração obtida para a fluvastatina com intervalo de concentração plasmática de 20 a 500 ng mL⁻¹.

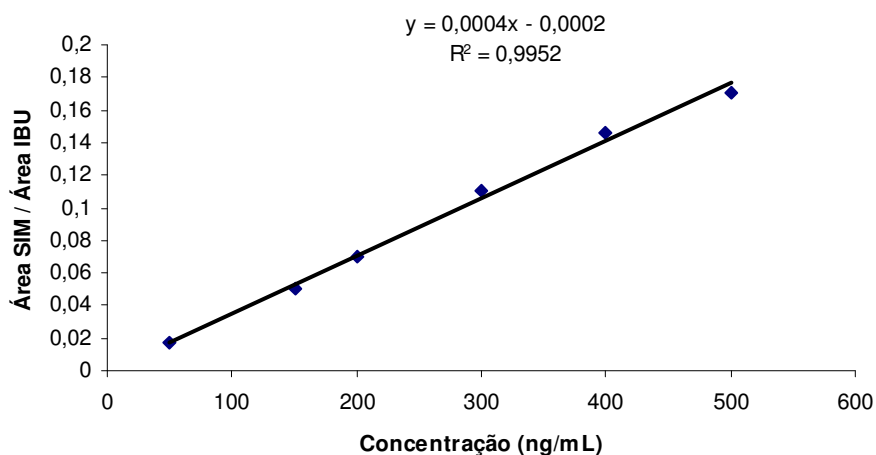


Figura 24 - Curva de calibração obtida para a simvastatina com intervalo de concentração plasmática de 50 a 500 ng mL⁻¹.

4.5.3 Precisão

Os estudos de precisão intra-dia foram realizados em três níveis de concentração (baixo, médio e alto) com cinco replicatas por concentração. Na avaliação da precisão inter-dia utilizou-se os mesmos níveis de concentração (baixo, médio e alto) em triplicata. Foi considerado como limite máximo o valor de 15% para o DPR, exceto para o LOQ, o qual se admite valores menores ou iguais a 20%. Os resultados das Tabelas 14 e 15 demonstram que o método desenvolvido possui precisão adequada.

Tabela 14 - Dados obtidos da precisão intra-dia para os fármacos estudados.

Compostos	Concentração (ng mL ⁻¹)	DPR (%)
Fluvastatina	20	8,96
	250	4,06
	500	6,92
Simvastatina	50	13,57
	300	6,59
	500	8,33

Tabela 15 - Dados obtidos da precisão inter-dia para os fármacos estudados.

Compostos	Concentração (ng mL ⁻¹)	DPR (%)
Fluvastatina	20	7,23
	250	2,75
	500	8,70
Simvastatina	50	10,52
	300	7,19
	500	7,44

4.5.4 LOQ e LOD

O limite de detecção foi estabelecido pela análise de amostras de plasma fortificadas com soluções de concentrações decrescentes dos fármacos até o menor nível detectável. O LOD foi estabelecido como a concentração em que o pico do analito era três vezes maior que o ruído da linha de base. O LOD encontrado foi de 7,5 ng mL⁻¹ para fluvastatina e 15 ng mL⁻¹ para a simvastatina.

Já o limite de quantificação foi determinado utilizando a razão 10:1 da altura do pico em relação à altura do ruído da linha de base, com coeficiente de variação menor que 20%. O LOQ estabelecido foi de 20 ng mL⁻¹ para a fluvastatina e 50 ng mL⁻¹ para a simvastatina (Tabela 16).

Tabela 16 - Dados obtidos de Limites de Quantificação (LOQ) e Detecção (LOD) para os fármacos estudados.

Compostos	LOQ (ng mL ⁻¹)	DPR%	LOD (ng mL ⁻¹)	DPR%
Fluvastatina	20	8,30	7,5	11,74
Simvastatina	50	11,00	15	14,96

4.5.5 Recuperação

As taxas de recuperação do método SPME-GC-MS para análise de estatinas em plasma foram inferiores a 40% (Tabela 17). No entanto, este fato não implica em linearidade e precisão insatisfatórias.

O uso do padrão interno às amostras compensa as variações na eficiência do processo SPME, tais como a composição endógena do plasma e as propriedades da fase extratora (diminuição da eficiência da fibra com o aumento do número de extrações).

A ANVISA recomenda porcentagens de recuperação do soluto e do padrão interno próximos a 100%, porém admitem-se valores menores desde que a recuperação seja precisa.

Tabela 17 - Dados obtidos da recuperação relativa para as estatinas estudadas.

Compostos	Concentração (ng mL ⁻¹)	Recuperação (%)
Fluvastatina	20	17,94
	250	21,53
	500	22,12
Simvastatina	50	28,79
	300	33,37
	500	38,63

A análise dos resultados mostra que a SPME, quando comparada com outras técnicas de extração, apresenta baixos valores de recuperação. No entanto, são valores comuns quando utiliza-se uma técnica em micro escala, na qual a extração não é exaustiva, isto é, não ocorre a extração total dos analitos.

Nesta técnica, a influência das proteínas foi minimizada por meio da diluição das amostras de plasma com solução de ácido fórmico 0,5M pH = 3,0, podendo assim obter boas taxas de recuperação. O processo de diluição das amostras de plasma diminui a viscosidade da matriz, favorecendo a difusão dos fármacos para a fase extratora da fibra de SPME.

4.5.6 Aplicação em amostras reais de plasma

A eficácia do método SPME-GC-MS para uso clínico foi comprometida devido ao alto valor de LOQ encontrado para a simvastatina (50 ng mL^{-1}), uma vez que o intervalo terapêutico para uma dose diária de 10 a 80 mg/dia do fármaco é de 10,30 a $34,50 \text{ ng mL}^{-1}$.

Dessa forma, analisou-se amostras de plasma de pacientes que fizeram uso de uma dosagem maior de simvastatina, a fim de avaliar possíveis níveis tóxicos do fármaco.

As amostras de plasma foram adquiridas no Laboratório Médico Dr. Maricondi e na Casa de Saúde de São Carlos. Essas amostras foram centrifugadas a 8000 rpm durante 5 minutos, filtradas com membrana hidrofílica de $0,45 \mu\text{m}$ e tratadas conforme descrito no item 3.5.5.

A Tabela 18 mostra os resultados obtidos nas análises de amostras de plasma de pacientes que fizeram uso de simvastatina.

Tabela 18 - Concentração plasmática determinada em amostras de plasma de pacientes em terapia com simvastatina.

Amostra	Concentração plasmática (ng mL^{-1})
1	< LOQ
2	79,80
3	< LOQ
4	< LOQ
5	85,00

O perfil dos picos cromatográficos foram similares aos obtidos nas análises de amostras de plasma branco enriquecidos com simvastatina, com nenhuma interferência aparente observada no tempo de retenção deste fármaco (Figura 25).

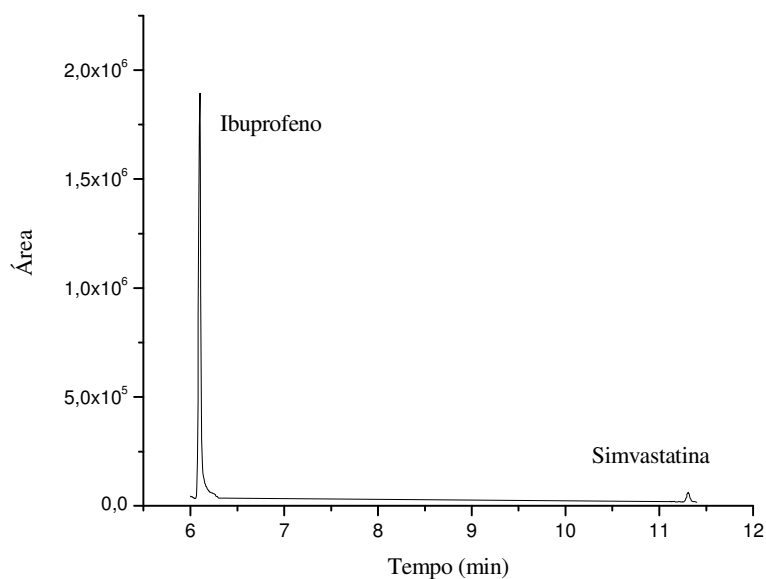


Figura 25 - Análise de amostras de plasma de pacientes que administraram dosagens superiores a doses terapêuticas de simvastatina.

Através da análise das concentrações plasmáticas determinadas nas amostras de plasma de pacientes em terapia com simvastatina observa-se que algumas estão abaixo do LOQ (50 ng mL^{-1}), impossibilitando a quantificação do fármaco no intervalo terapêutico. No entanto, encontrou-se valores de concentrações plasmáticas superiores às dosagens terapêuticas, isto pode ser explicado pelo tratamento de alguns pacientes com uma dosagem maior de simvastatina. Dessa maneira, este estudo torna possível a determinação de níveis tóxicos causados por uma dosagem excessiva do fármaco.

5
Conclusão

5. CONCLUSÃO

A SPME juntamente com a derivatização *in situ* possuem algumas variáveis que foram otimizadas para obtenção de um processo de extração mais eficiente. Essa otimização foi realizada utilizando planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta que mostraram ser uma ferramenta eficaz, possibilitando uma otimização completa, com um menor número de experimentos, e avaliando não só os efeitos principais como também os efeitos de interação de todas as variáveis na resposta obtida.

O planejamento fatorial empregado neste estudo permitiu otimizar as condições de extração e derivatização das estatinas em plasma utilizando fibra de PDMS-DVB, 10 mL de solução de ácido fórmico 0,5 mol L⁻¹ pH = 3,0; 100 µL de TBA-Br 0,1 mol L⁻¹, 50 µL de dietil sulfato e 45 minutos de extração à 55°C.

O método SPME-GC-MS desenvolvido apresentou linearidade, seletividade e precisão adequados para a análise de estatinas em plasma humano. Porém, o LOQ encontrado não possibilitou a análise dos analitos em concentrações correspondentes ao intervalo terapêutico. Dessa maneira, a eficácia do método foi comprovada através da análise de amostras de pacientes em terapia com dosagens superiores a doses terapêuticas de simvastatina. Portanto, o método em estudo pode ser aplicado para determinação de níveis tóxicos de estatinas em amostras de plasma humano.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-REHIM, M.; HASSAN, Z.; BLOMBERG, L.; HASSAN, M. On-line derivatization utilizing solid-phase microextraction (SPME) for determination of busulphan in plasma using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 25, n. 3, p. 400-406, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de jun. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 21 out. 2010

ALMEIDA, C.; ROSÁRIO, P.; SERÔDIO, P.; NOGUEIRA, J. M. F. Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica. **Química**, v. 95, p. 69-77, 2004.

ALPENDURADA, M. F. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 889, p. 3-14, 2000.

ARTHUR, C.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145-2148, 1990.

BAHRAMI, G.; MOHAMMADI, B.; MIRZAEEL, S.; KIANI, A. Determination of atorvastatin in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with UV detection. **Journal of Chromatography B**, v. 826, p. 41-45, 2005.

BARRETT, B.; HUCLOVÁ, J.; BOŘEK-DOHALSKÝ, V.; NĚMEC, V.; JELÍNEK, I. Validated HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of simvastatin and simvastatin hydroxy acid in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 2, p. 517-526, 2006.

BERMEJO, A. M.; SEARA, R.; LUCAS, A. C. S.; TABERNERO, M. J.; FERNÁNDEZ, P.; MARSILI, R. Use of solid-phase microextraction (SPME) for the determination of methadone and its main metabolite, EDDP, in plasma by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 24, n. 1, p. 66-69, 2000.

BOREK-DOHALSKÝ, V.; HUCLOVÁ, J.; BARRETT, B.; NEMEC, B.; ULC, I.; JELÍNEK, I. Validated HPLC-MS-MS method for simultaneous determination of atorvastatin and 2-hydroxyatorvastatin in human plasma-pharmacokinetic study. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, n. 2, p. 275-85, 2006.

CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 425-430, 2007.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

DENG, C.; LI, N.; JI, J.; YAN, B. Development of water-phase derivatization followed by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry for fast determination of valproic acid in human plasma. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 8, p. 1281-1287, 2006.

DOMENIC, A.; SICA, M. D.; TODD, W. B.; GEHR, M. D. Rhabdomyolysis and statin therapy: relevance to the elderly. **The American Journal of Geriatric Cardiology**, v. 11, n. 1, p. 48-55, 2002.

ERTURK, S.; ONAL, A.; CETIN, S. M. Analytical methods for the quantitative determination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in biological samples. **Journal of Chromatography B**, v. 793, p. 193-205, 2003.

FERNANDES, Christian. **Otimização da extração, separação cromatográfica, identificação e quantificação de fármacos em fluidos biológicos**. 2006. 220 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

FOLLADOR, M. J. D.; YONAMINE, M.; MOREAU, R. L. M.; SILVA, O. A. Detection of cocaine and cocaethylene in sweat by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 811, n.1, p. 37-40, 2004.

FRISON, G.; TEDESCHI, L.; MAIETTI, S.; FERRARA, S. D. Determination of midazolam in human plasma by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 15, n. 24, p. 2497-2501, 2001.

FU, X. F.; LIAO, Y. P.; LIU, H. W. Sample preparation for pharmaceutical analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, n.1, p. 75-77, 2005.

GALLARDO, E.; BARROSO, M.; MARGALHO, C.; CRUZ, A.; VIEIRA, D. N.; LÓPEZ-RIVADULLA, M. Determination of quinalphos in blood and urine by direct solid-phase

microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 832, n. 1, p. 162-168, 2006.

GÓRZECKI, T.; YU, X.; PAWLISZYN, P. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. **The Analyst**, v.124, p. 643-649, 1999.

GUILLÉN, D.; COFÁN, F.; ROS, E.; MILLÁN, O.; COFÁN, M.; RIMOLA, A.; BRUNET, M. Determination of atorvastatin and its metabolite ortho-hydroxyatorvastatin in human plasma by on-line anion-exchange solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 394, n. 6, p. 1687-1696, 2009.

HELFENSTEIN, F. A. Farmacocinética das estatinas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, supl. 5, p. 9-14, 2005.

HERMANN, H. M.; REUBSAET, J. L. E. Determination of atorvastatin and metabolites in human plasma with solid-phase extraction followed by LC–tandem MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, n. 5, p. 1242-1249, 2005.

JEMAL, M.; OUYANG, Z.; POWELL, M. L. Direct-injection LC–MS–MS method for high-throughput simultaneous quantitation of simvastatin and simvastatin acid in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, n. 2-3, p. 323-340, 2000.

KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 232-244, 2003.

KAWAGUCHI, M.; ITO, R.; SAITO, K.; NAKAZAWA, H. Novel stir bar sorptive extraction methods for environmental and biomedical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 500-508, 2006.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993. 254 p.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RIMA, 2006. 62 p.

LEE, M. R.; SONG, Y. S.; HWANG, B. H.; CHOU, C. C. Determination of amphetamine and methamphetamine in serum via headspace derivatization solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 896, n. 1-2, p. 265-273, 2000.

LEIS, H. J.; WINDISCHHOFER, W. Quantitative determination of fluvastatin in human plasma by gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry using [$^{18}\text{O}_2$]-fluvastatin as an internal standard. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 2, p.128–132, 2005.

LI, N.; DENG, C.; ZHANG, X. Determination of methylmalonic acid and glutaric acid in urine by aqueous-phase derivatization followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 2, p. 266-271, 2007.

LIU, Y.; MURALIDHARA, S.; BRUCKNER, J. V.; BARTLETT, M. G. Trace level determination of trichloroethylene in biological samples by headspace solid-phase microextraction gas chromatography/negative chemical ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 6, p. 797–806, 2008.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p.153-193, 2000.

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

MAJORS, R. E. An overview of sample preparation. **LC-GC**, v. 9, p. 16-20, 1991.

MAJORS, R. E. New approaches to sample preparation. **LC-GC**, v. 13, p. 82-94, 1995.

MEROLA, G.; GENTILI, S.; TAGLIARO, F.; MACCHIA, T. Determination of different recreational drugs in hair by HS-SPME and GC/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 7, p. 2987-2995, 2010.

NAMERA, A.; YASHIKI, M.; LIU, J.; OKAJIMA, K.; KENJI, K.; IMAMURA, T.; KOJIMA, T. Simple and simultaneous analysis of fenfluramine, amphetamine and methamphetamine in whole blood by gas chromatography–mass spectrometry after headspace–solid phase microextraction and derivatization. **Forensic Science International**, v. 109, n. 3, p. 215-223, 2000.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos - Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Campinas: Unicamp, 2007. 480 p.

NETO, B. B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Unicamp, 1995. 299 p.

NIROGI, R.; MUDIGONDA, K.; KANDIKERE, V. Chromatography–mass spectrometry methods for the quantitation of statins in biological samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 379-387, 2007.

NIROGI, R. V. S.; KANDIKERE, V. N.; MUDIGONDA, M. S. K. Simultaneous quantification of atorvastatina and active metabolites in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using rosuvastatin as internal standard. **Biomedical Chromatography**, v. 20, p. 924-936, 2006.

NIROGI, R.V.S.; KANDIKERE, V. N.; SHRIVASTAVA, W.; MUDIGONDA, K.; DATLA, P. V. Liquid chromatography/negative ion electrospray tandem mass spectrometry method for the quantification of fluvastatin in human plasma: validation and its application to pharmacokinetic studies. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 8, p.1225-1230, 2006.

NOVÁKOVÁ, L.; ŠATÍNSKÝ, D.; SOLICH, P. HPLC methods for the determination of simvastatin and atorvastatina. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 4, p. 352-367, 2008.

NOVÁKOVÁ, L.; VLČKOVÁ, H.; ŠATÍNSKÝ, D.; SADÍLEK, P.; SOLICHOVÁ, D.; BLÁHA, M.; BLÁHA, V.; SOLICH, P. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometric detection in clinical analysis of simvastatin and atorvastatina. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 22, p. 2093-2103, 2009.

OLIVEIRA, L. S.; INOUE, J. K.; MACHINSKI JUNIOR, M.; NISHIYAMA, P. Atenção farmacêutica na monitorização terapêutica de fármacos. **Arquivos da Apadec**, supl.8, p. 892-895, 2004.

PAOLETTI, R.; CORSINI, A.; BELLOSTA, S. Pharmacological interactions of statins. **Atherosclerosis Supplements**, v. 3, p. 35-40, 2002.

PARADIS, C.; DUFRESNE, C.; BOLON, M.; BOULIEU, R. Solid-phase microextraction of human plasma samples for determination of sufentanil by gas chromatography-mass spectrometry. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 24, n. 6, p. 768-774, 2002.

PATEL, B. N.; SHARMA, N.; SANYAL, M.; SHRIVASTAV, P. S. Simultaneous determination of simvastatin and simvastatin acid in human plasma by LC-MS/MS without

polarity switch: Application to a bioequivalence study. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 2, p. 301-313, 2008.

PIETRO, G.; COELHO, E. B.; GELEILETE, T. M.; MARQUES, M. P.; LANCHOTE, V. L. Chiral evaluation of fluvastatin in human plasma by high-performance liquid chromatography electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 832, n. 2, p. 256-261, 2006.

QUEIROZ, M. E. C. Microextração em fase sólida para análise de fármacos em fluidos biológicos. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 3, p. 11-19, 2009.

QUEIROZ, M. E. C.; LANÇAS, F. M. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida “no tubo” e cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 880-886, 2005.

QUEIROZ, M.E.C.; LANÇAS, F. M. Practical tips on preparing plasma samples for drug analysis using SPME. **LC-GC**, v. 22, n. 10, p. 970-980, 2004.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SHA, Y.; DENG, C.; LIU, Z.; HUANG, T.; YANG, B.; DUAN, G. Headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatographic-mass spectrometric determination of rivastigmine in canine plasma samples. **Journal of Chromatography B**, v. 806, n. 2, p. 271-276, 2004.

STAERK, U.; KÜLPMANN, W. R. High-temperature solid-phase microextraction procedure for the detection of drugs by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 745, n. 2, p. 399-411, 2000.

STASHENKO, E. E.; MARTINEZ, J. R. Derivatization and solid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 553-561, 2004.

SUCHARA, Eliane Aparecida. **Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de fármacos em fluidos biológicos e amostras ambientais por cromatografia líquida e gasosa**. 2007. 145 f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração em fase sólida. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 523-529, 2000.

WHEELER, D. C. Are there potential non-lipid-lowering uses of statins? **Drugs**, v. 56, n. 4, p. 517-522, 1998.

YANG, A. Y.; SUN, L.; MUSSON, D. G.; ZHAO, J. J. Application of a novel ultra-low elution volume 96-well solid-phase extraction method to the LC/MS/MS determination of simvastatin and simvastatin acid in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n. 3, p. 521-527, 2005.

YANG, H.; FENG, Y.; LUAN, Y. Determination of simvastatin in human plasma by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.785, n. 2, p. 369-375, 2003.

ZHANG, N.; YANG, M.; ROGERS, J. D.; ZHAO, J. J. Quantitative analysis of simvastatin and its β -hydroxy acid in human plasma using automated liquid–liquid extraction based on 96-well plate format and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, n. 1, p. 175-187, 2004.