

Microextração em fase sólida para análise de fármacos em fluidos biológicos



Maria Eugênia C. Queiroz

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto
14040-901 – Ribeirão Preto (SP)
Brasil.
mariaeqn@ffclrp.usp.br

Resumo

Os aspectos teóricos da microextração em fase sólida (SPME), e um resumo geral dos principais fatores que influenciam a eficiência da extração, tais como: revestimento da fibra (fase estacionária), tempo da extração, pH e força iônica da matriz, aditivos orgânicos, temperatura, agitação, influência das proteínas e processo de dessorção são discutidos. As recentes aplicações da literatura nas áreas farmacêutica, biomédica e toxicologia social, assim como parâmetros de validação analítica dos métodos desenvolvidos são também descritos.

Palavras-chave

Microextração em fase sólida, fármacos, amostras biológicas.

Abstract

The theoretical aspects of solid-phase microextraction (SPME), and general overview of the important factors in the optimization of extraction efficiency such as coating (stationary phase) fiber types, extraction time, matrix pH, ionic strength, effect of organic additives, temperature, degree of agitation, influence of protein, and desorption conditions are discussed. The recent published applications and method validation issues are also described in the areas of pharmaceutical, biomedical, and social toxicology.

Keywords

solid-phase microextraction; drugs; biological samples.

1. Introdução¹⁻³⁶

A microextração em fase sólida foi introduzida por Arthur e Pawlitzyn em 1990. A extração e concentração do soluto ocorrem através dos processos de absorção ou adsorção do soluto em uma fina camada de fase extratora (7 a 100 μm de espessura), polimérica ou adsorvente, que reveste a superfície

externa de uma fibra de sílica fundida (10 mm de comprimento e 110 a 160 μm de diâmetro). A Figura 1a ilustra a agulha de aço inox (microtubo) com a fibra de sílica fundida revestida com fase extratora SPME (10 mm), a qual é rosqueada junto ao dispositivo comercial SPME (Figura 1b). As fibras de sílica fundida são frágeis, portanto, em procedimentos que possam danificá-las, tais como a introdução no

septo do frasco da amostra ou do injetor do cromatógrafo a gás (GC), estas têm sido retraídas para o interior da agulha através do movimento do êmbolo do dispositivo SPME.

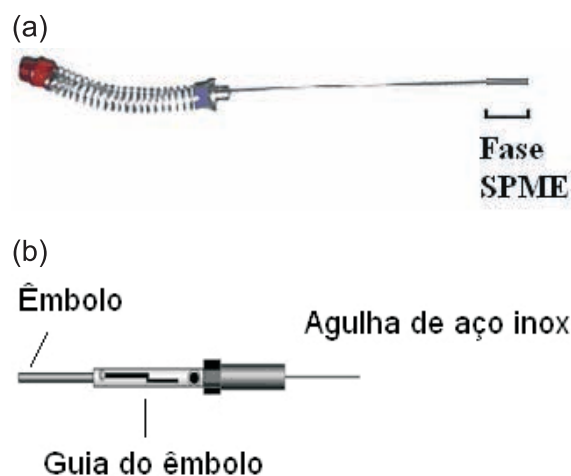


Figura 1. (a) Agulha de aço inox com a fibra de sílica fundida revestida com fase SPME (10 mm), (b) dispositivo comercial para SPME.

O sistema de extração consiste das fases, aquosa (amostra homogênea), polimérica (fase SPME) e gasosa (*headspace* do frasco). Durante a extração em um sistema trifásico, considerado ideal, os solutos migram entre as três fases até que o equilíbrio de partição seja atingido. Desta forma, a massa extraída está relacionada ao equilíbrio de massas do soluto nas fases do sistema. A massa total do soluto deverá permanecer constante durante a extração, podendo ser expressa segundo a equação 1:

$$C_0 V_s = C_f^e V_f + C_h^e V_h + C_s^e V_s \quad (\text{eq.1})$$

Onde, C_0 representa a concentração inicial do soluto na amostra. C_f^e , C_h^e , C_s^e as concentrações do soluto após atingir o equilíbrio de partição nas fases, polimérica, gasosa e na aquosa (amostra), respectivamente. V_f , V_h , V_s , os volumes das fases polimérica, gasosa e aquosa, respectivamente.

O número de mols do soluto (n) sorvido pela fase polimérica e as constantes de partição do soluto entre as fases polimérica/gasosa (K_{fh}) e gasosa/aquosa (K_{hs}) podem ser definidos segundo as fórmulas descritas a seguir:

$$n = C_f^e V_f$$

$$K_{fh} = C_f^e / C_h^e \quad K_{hs} = C_h^e / C_s^e$$

Após rearranjos matemáticos, a quantidade de soluto extraído (número de mols), após atingir o equilíbrio de partição poderá ser expressa através da equação 2:

$$n = \frac{K_{fh} K_{hs} V_f V_s C_0}{K_{fh} K_{hs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \quad (\text{eq.2})$$

Segundo a Equação 2, a quantidade de soluto absorvido ou adsorvido pela fibra, após atingir o equilíbrio de sorção, é linearmente relacionada à concentração inicial do soluto na amostra, permitindo, assim, a análise quantitativa.

2. Processo SPME¹⁻⁵

O processo SPME é ilustrado na Figura 2a. A amostra é colocada em um frasco com tampa rosca e septo. Com a fibra retraída no interior da agulha do dispositivo SPME, o septo do frasco é perfurado, e com o movimento do êmbolo do dispositivo SPME, a fibra SPME é exposta diretamente na amostra ou no *headspace* do frasco. Após o término da extração, ou seja, após atingir o equilíbrio de partição do soluto entre as fases, a fibra é novamente retraída para o interior da agulha do dispositivo SPME.

Para a dessorção térmica de solutos voláteis ou semivoláteis, nas análises realizadas por cromatografia gasosa (SPME-CG), a agulha do dispositivo SPME (fibra retraída) tem sido inserida no septo do injetor (aquecido adequadamente) e a fibra exposta no *liner*, (Figura 2b). A introdução das amostras, nas análises SPME/GC, geralmente, tem sido realizada no modo *splitless*.

Para a dessorção dos solutos não voláteis ou termolábeis, nas análises por cromatografia líquida (SPME-LC), uma interface SPME-LC apropriada, em forma de um T (Figura 2c), tem sido utilizada, onde a fibra é inserida na extremidade superior e as demais extremidades, lateral e inferior, são conectadas à válvula de seis pórticos do LC. A dessorção dos solutos poderá ser realizada no modo dinâmico, com a fase móvel, ou modo estático. Neste último modo, a fibra, anterior a eluição dos solutos para a coluna cromatográfica, permanece na câmara da interface, em contato com determinado volume de fase móvel ou de solvente orgânico, durante um intervalo de tempo, para dessorção em fase líquida dos solutos.

Para análises SPME/LC, a dessorção em fase líquida *off-line* também tem sido utilizada. Neste modo, a fibra SPME é inserida em microtubo cônico, contendo alguns μL de fase líquida (fase móvel ou solvente orgânico) e os solutos são dessorvidos com

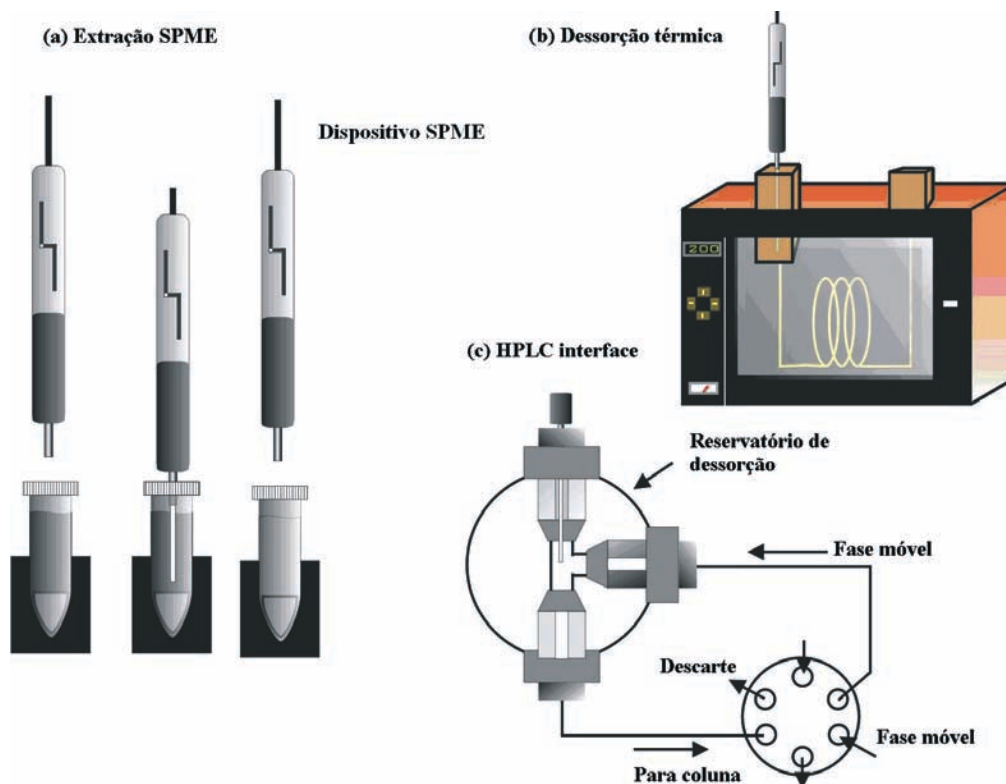


Figura 2. (a) Processo de extração SPME. (b) Dessorção térmica dos solutos extraídos para análises GC. (c) Dessorção em fase líquida na interface LC (c).

ou sem agitação (magnética ou sonicação) e controle de temperatura. Uma pequena alíquota do extrato obtido é injetada (injetor convencional) no LC.

As fibras SPME-LC, anterior ao processo de extração, deverão ser condicionadas com a fase móvel ou com o solvente utilizado no processo de dessorção. As fibras utilizadas em GC deverão ser condicionadas à temperatura e intervalo de tempo recomendados pelo fabricante. Geralmente, cada fibra SPME tem sido utilizada de 50 a 100 vezes, dependendo da complexidade da matriz da amostra e dos cuidados do analista tanto no manuseio quanto na limpeza da fibra.

A SPME tem sido realizada no modo direto (DI, imersão direta da fibra na amostra) ou indireto (HS, exposição da fibra no *headspace* do frasco). A seleção do modo de extração tem sido baseada na composição da amostra e na volatilidade do soluto. O modo indireto evita danos na fibra, causados tanto pela dessorção não eficiente de substâncias de alta massa molar (proteínas e matéria orgânica), quanto pelos reagentes adicionados às amostras, para ajuste de pH ou força iônica. Desta forma, o modo indireto é mais seletivo e gera cromatogramas livres de interferentes. Quando a fibra entra em contato com a fase gasosa, os solutos são removidos primeiro da fase gasosa, seguido pela extração indireta dos solutos da fase aquosa.

A temperatura tem efeito significativo na cinética do processo HS-SPME, pois determina a pressão de vapor dos solutos. Em geral, no modo HS-SPME, o tempo necessário para atingir o equilíbrio de partição, para compostos voláteis, é menor quando comparado com o modo DI-SPME. Pois, a maior concentração dos solutos está presente na fase gasosa, e o coeficiente de difusão nesta fase é maior quando comparado com a fase aquosa⁶⁻⁹.

3. Fases extratoras

A seleção da fase extratora é determinada pelas propriedades físico-químicas do soluto, tais como: a polaridade, massa molar e volatilidade do soluto. A simples regra “similar solubiliza similar” pode ser aplicada para as fases líquidas.

As principais fases extratoras disponíveis no comércio são as seguintes: polidimetilsiloxano (PDMS, apolar, espessuras: 7, 30 e 100 μm), poliacrilato (PA, polar, espessura: 85 μm), polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB, espessuras: 60 e 65 μm), carboxen-PDMS (CAR-PDMS, espessura: 75 μm), carbowax-DVB (CW-DVB, espessura: 65 μm), carbowax-resina

TPR-100 suportada (CW-TRP, polar, espessura 50 µm), divinilbenzeno-CAR-PDMS (DVB/CAR/PDMS, espessuras: 30 e 50 µm), CBW-polietileno glicol (CBW-PEG, polar) e carbopack Z.

Nos revestimentos líquidos, o mecanismo de extração é baseado na partição (absorção), já nos adsorventes sólidos, adsorção.

O processo de derivação/SPME de compostos polares em análogos menos polares tem sido realizado para aumentar a sensibilidade e seletividade do método analítico SPME/GC. A derivação tem sido realizada diretamente na amostra (matriz), anterior ao processo SPME¹⁰, no injetor GC, processo simultâneo à dessorção térmica¹¹ e na fibra, após procedimento SPME, com a exposição da fibra no *headspace* do frasco contendo o reagente derivatizante volatilizado¹².

Em razão das vantagens das técnicas SPME/GC, tais como: ausência de solvente no processo de dessorção, extração no *headspace*, onde não ocorre a interação da matriz da amostra com a fase

SPME e rápida e eficiente dessorção térmica; o número de publicações, abordando as técnicas SPME/GC, tem sido bem maior, quando comparado com as técnicas SPME-LC, Tabela 1.

4. Recentes aplicações da técnica SPME para análise de fármacos em fluidos biológicos

A técnica SPME, embora tenha sido introduzida inicialmente para extração de compostos voláteis e semivoláteis em amostras ambientais, desde 1995, tem sido aplicada para análises 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 recentes aplicações SPME nesta área.

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

Fármaco (matriz)	Modo de Extração (Fibra)	Sistema Analítico (LQ ou LD)	Observações	Referências
Metadona e seus principais metabólitos (plasma)	DI (PDMS)	GC-MS (LD: 40 ng mL ⁻¹)	Pacientes em terapia com metadona	Bermejo <i>et al.</i> 2000 ¹³
Anfetaminas (soro)	DI + HS (PDMS)	GC-MS (LD: 0.05 –0.6 µg L ⁻¹)	Drogas de abuso Derivação após a extração HFBA	Lee <i>et al.</i> 2000 ¹⁴
Anfetaminas (sangue total)	HS (PDMS)	GC-MS (LD: 5.0 –10.0 ng g ⁻¹)	Dessorção e derivação simultânea HFBA	Namera <i>et al.</i> 2000 ¹⁵
Drogas ilícitas (soro e urina)	HS (PA)	GC-MS (LQ 10-30 µg mL ⁻¹)	<i>Screening</i> drogas	Staerk e Kulpmann 2000 ¹⁶
Levomopromazina (plasma)	DI (PDMS)	GC-NPD (LQ: 5 ng mL ⁻¹)	Monitorização terapêutica	Krugger e Ulrich 2000 ¹⁷
Midazolam (plasma)	DI (PA)	GC-MS (SIM) (LD: 1.0 ng mL ⁻¹)	Monitorização terapêutica	Frison <i>et al.</i> 2001 ¹⁸
Canabinóides (saliva)	DI (PDMS)	GC-MS	Usuário de drogas de abuso	Fucci <i>et al.</i> 2001 ¹⁹
Busulfan (plasma)	DI (CW-DVB)	GC-MS (LQ: 20 ng mL ⁻¹)	Derivação durante SPME	Abdel-Rehim <i>et al.</i> 2003 ²⁰
Amitraz (plasma canino)	DI (PDMS)	GC-TSD (LQ: 20 ng mL ⁻¹)	Análise toxicológica	Queiroz <i>et al.</i> 2003 ²¹
Cocaína, cocaetileno (suor)	DI (PDMS)	GC-MS (LD: 5 ng mL ⁻¹)	Associação cocaína etanol – usuários	Silva <i>et al.</i> 2004 ²²
Acetona (plasma)	HS (PDMS/DVB)	GC-MS (LD: 0.004 nM)	Derivação na fibra PFBHA	Deng <i>et al.</i> 2004 ²³
Rivastigmina (plasma)	DI (PDMS-DVB)	GC-MS (LQ: 0.2 ng mL ⁻¹)	Avaliação em cães	Sha <i>et al.</i> 2004 ²⁴

Tabela 1. Continuação.

Fármaco (matriz)	Modo de Extração (Fibra)	Sistema Analítico (LQ ou LD)	Observações	Referências
Benzodiazepínicos (sangue)	DI	LC-MS (LD: 20 – 35 ng mL ⁻¹)	Fase ADS –RAM	Pawliszyn <i>et al.</i> 2004 ²⁵
Fármacos (urina)	DI (PDMS, PA)	LC-fluorescência (LQ 0.001-0.1 µg mL ⁻¹)		Theodoridis <i>et al.</i> 2004 ²⁶
Voláteis (sangue)	HS (CAR/PDMS)	GC-MS (LD: 0.26-0.032 nM)	Biomarcadores voláteis - câncer no pulmão	Deng <i>et al.</i> 2004 ²⁷
Organofosforados	DI (PA)	GC-NPD (LD: 2 to 55 ng mL ⁻¹)	Análise toxicológica	Tsoukali <i>et al.</i> 2005 ²⁸
Ácido valpróico (plasma)	HS (PDMS)	GC/MS (LQ 0.3 µg mL ⁻¹)	Estudo de farmacocinética	Zhang <i>et al.</i> 2006 ²⁹
Paration (Urina e sangue)	CW/DVB	GC/MS (LD: 10 ng mL ⁻¹ -urina 50 ng mL ⁻¹ sangue)	100 µL da amostra	López-Rivadulla <i>et al.</i> 2006 ³⁰
Anticonvulsivantes e antidepressivos tricíclicos	DI (CW-TPR PDMS-DVB)	LC-UV Antidepressivos: 75 ng mL ⁻¹ Anticonvulsivantes: 0,5-5 µg mL ⁻¹	Monitorização terapêutica	Queiroz <i>et al.</i> 2006 ³¹
Ácido metilmalônico e glutárico (urina)	HS (PDMS)	GC/MS (LD: 21-34 nM)	Derivação <i>in-situ</i> HS-SPME/GC/MS	Zhang and Deng 2007 ³²
Benzodiazepínicos (PBS)	DI (Anticorpos específicos imobilizados em barras de vidro)	LC-MS/MS (LD: 0.001-0.015 ng mL ⁻¹)	SPME imunoafinidade	Pawliszyn <i>et al.</i> 2007 ³³
Antidepressivos não tricíclicos	DI (PDMS/DVB)	LC-UV Antidepressivos: 25-50 ng mL ⁻¹	Monitorização terapêutica	Queiroz <i>et al.</i> 2009 ³⁴
Clembuterol (urina e soro)	PDMS/DVB	LC-UV (LQ: 32 ng mL ⁻¹ - urina, 24 ng/mL ⁻¹ - soro)	<i>Doping</i> atletas	Zambonin <i>et al.</i> 2008 ³⁵
Benzodiazepínicos (ratos <i>in vivo</i> SPME)	DI (Pirrol monômero)	LC/MS-MS (LD: 5 ng mL ⁻¹)	Estudo de farmacocinética	Pawliszyn <i>et al.</i> ; 2008 ³⁶
Tricloroetileno (sangue, fígado, rins, cérebro e pulmões de rato).	HS (PDMS)	GC-MS (LD: 0,25 ng mL ⁻¹ sangue 0,75 ng mL ⁻¹ tecidos)	Toxicinética Após administração de baixa dose	Bartlett <i>et al.</i> 2008 ³⁷
Anestésicos e analgésicos (urina)	HS (PDMS)	GC-NPD (LD: 0,01 – 15 ng mL ⁻¹)	Pacientes Após operações cirúrgicas	Tsoukali <i>et al.</i> 2009 ³⁸
MEK, IPA, DMF, ACE, NMF (metabólito IPA) and DMF. (saliva)	HS (CAR/PDMS)	GC-MS (LD: 0.004 (ACE) , 0.003 (MEK), 0.006 (IPA), 0.05 (DMF) e 0.10 µg/mL (NMF))	Avaliação da exposição a solventes tóxicos Amostra não invasiva	Wang & Lu 2009 ³⁹
Antidepressivos não tricíclicos	DI (Polipirrol)	LC-UV Antidepressivos: 16-25 ng mL ⁻¹	Eletropolimerização Polipirrol – haste metálica	Queiroz <i>et al.</i> 2007 ⁴⁰

LQ: limite de quantificação, LD: Limite de detecção, PFBHA: O-2,3,4,5,6 hidrocloreto (pentafluorobenzil) de hidroxilamina, HFBA: anidrido heptafluorobutírico, PBS: Tampão fosfato pH 7.4, ADS-RAM: alquil-diol-silica – material de acesso restrito, LC-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, NPD: detector de nitrogênio e fósforo, FID: detector de ionização de chama, UV: detector ultravioleta. MEK: metil etil cetona, IPA: álcool isopropílico, DMF: N,N-dimetil formamida, ACE: acetona, NMF: N-metil formamida.

5. Otimização das variáveis SPME

Em nossos estudos^{21,31,34,40}, as variáveis SPME dos processos de extração e dessorção, fase extratora, tempo, temperatura e velocidade de agitação, foram otimizadas. As fases extratoras SPME, disponíveis no mercado, não são trocadoras de íons; extraem somente espécies não iônicas. Os fármacos analisados, na sua maioria, bases fracas ou ácidos fracos, através do ajuste do pH das amostras de plasma, foram extraídos na forma não ionizada, ou parcialmente ionizados. Para assegurar que 99% dos compostos ácidos, presentes em uma amostra, sejam convertidos para a forma não iônica, o pH deverá ter valor, no mínimo, duas unidades abaixo do pKa do soluto; já para os solutos básicos, o pH deverá ter valor, no mínimo, duas unidades acima do pKb do soluto¹.

Como na maioria dos trabalhos, nós trabalhamos com análise simultânea de fármacos. O valor de pH da amostra de plasma, que resultou nas maiores taxas de extração, foi selecionado para dar continuidade aos experimentos de otimização das variáveis SPME. O ajuste do pH das amostras foi realizado através da adição de soluções-tampão às amostras de plasma. Desta forma, a razão entre as formas do fármaco, ionizada e não ionizada, permaneceu constante durante as extrações, favorecendo a linearidade do método. Para não danificar a fibra, valores extremos de pH (pH < 2 ou pH > 10) não foram utilizados.

A espessura do filme da fase extratora e a constante de sorção do fármaco (K_{fs}), entre a fase extratora e a amostra de plasma, determinaram a eficiência do processo SPME e o tempo de extração. Os filmes mais espessos apresentaram maiores taxas de extração. No entanto, maior tempo de extração foi necessário para atingir o equilíbrio de sorção.

A SPME não é um processo exaustivo, ou seja, requer a otimização do tempo de extração, correspondente ao equilíbrio de sorção dos fármacos com a fase extratora, intervalo no qual a massa dos fármacos extraídos permanece constante após tempo infinito, considerando o coeficiente de variação dos resultados.

Em nossos ensaios^{21,31,34,40}, o tempo de equilíbrio de sorção, geralmente, tem sido de 15 a 30 min. Na condição correspondente ao equilíbrio de sorção, pequenas variações no tempo de extração não afetaram a quantidade de fármaco extraído pela fibra. Nas determinações SPME/LC-UV de antidepressivos não tricíclicos, em razão do tempo de equilíbrio de sorção excessivamente longo (superior a 60 min),

menor tempo de extração (45 min) foi selecionado. Nesta condição, as variáveis do processo SPME, principalmente tempo e temperatura, foram rigorosamente controladas para assegurar a precisão analítica do método.

Dentre as fases avaliadas^{21,31,34,40}, PDMS-DVB (65 μm) e CW-DVB (65 μm) apresentaram os melhores resultados para análises de fármacos em amostras de plasma. Nestas fases mistas, o mecanismo de extração está baseado na teoria das isoterms de adsorção de Langmuir.

Esta teoria assume que as forças que atuam na adsorção são similares àquelas que envolvem combinação química, ou seja, as moléculas são adsorvidas e aderem à superfície do adsorvente em sítios definidos e localizados, com adsorção em monocamada em superfície homogênea; cada sítio pode acomodar uma, e somente uma, entidade adsorvida. A energia da entidade adsorvida é a mesma em todos os sítios da superfície e não depende da presença ou ausência de outras entidades adsorvidas nos sítios vizinhos, ou seja, apresenta interação desprezível entre as moléculas adsorvidas¹⁻³.

O número efetivo de sítios ativos na superfície da fase é limitado, quando todos os sítios estiverem ocupados, não poderá ser extraída quantidade adicional de soluto. Desta forma, a faixa de linearidade do método é pequena. Estas fases são apropriadas para extrações de solutos presentes em baixa concentração na amostra, ou em alta concentração, com extrações realizadas em pequeno intervalo de tempo¹⁻³. Os métodos padronizados apresentaram linearidade (faixa linear de concentração plasmática) adequada aos intervalos terapêuticos dos diferentes fármacos.

No modo DI-SPME, com o aumento da temperatura de extração, observa-se o aumento da concentração dos fármacos no *headspace* do frasco, assim como a constante de Henry, diminuindo o coeficiente de partição dos fármacos entre as fases, plasma e fase extratora, resultando em menor quantidade de soluto extraído¹⁻³. No entanto, observamos que o aumento de temperatura diminuiu a viscosidade das amostras de plasma, aumentando a transferência de massas dos fármacos para a fase extratora e diminuindo o tempo necessário para atingir o equilíbrio de sorção. A maioria dos fármacos foi extraída a 30°C.

A adição de sal inorgânico, geralmente NaCl (10%), à amostra biológica, aumentou a força iônica do meio (efeito *salting out*) e, conseqüentemente, aumentou a massa dos fármacos extraídos pela fase SPME. No entanto, nas determinações de amitraz, antidepressivos tricíclicos e antidepressivos não

tríclicos em amostras de plasma, os resultados demonstraram correlação inversa entre a quantidade de fármaco extraído e concentração de NaCl. Provavelmente, os íons do sal em solução interagiram com o fármaco, através da atração eletrostática, resultando em menores taxas de extração.

Em nossos trabalhos^{21,31,34,40}, as extrações SPME foram realizadas no modo direto, com a inserção da fibra diretamente na amostra de plasma diluída com solução tampão. Nesse modo, a agitação foi requerida para reduzir o “efeito da camada estática”. O fluido em contato com a fibra encontra-se estacionário e, à medida que a distância em relação à superfície da fibra torna-se maior, o movimento do fluido gradualmente aumenta, até igualar-se ao da maioria da amostra. Esta região de camada estática é denominada camada limite de Prandtl¹⁻³. A espessura da camada é determinada pelas condições de agitação e viscosidade do fluido, ou seja, o aumento da velocidade agitação diminui a espessura da camada estática e aumentou a transferência de massas dos fármacos para a fase extratora.

A agitação magnética, por sua simplicidade, foi empregada em nossos experimentos. Outras técnicas demandam dispositivos mais complexos, tais como: vibração da fibra, movimentação circular do frasco e sonicação. Nas extrações SPME, a fibra deve ser inserida próxima a parede do frasco, ou seja, fora do alcance do cone formado pelo processo de agitação.

Tanto nas análises GC quanto nas análises LC, após o procedimento de dessorção, as fibras SPME foram reutilizadas em outras extrações. O efeito de memória (*carryover*), ou seja, a presença do soluto nas fibras, após a dessorção, foi avaliado através do monitoramento da linha de base de cromatograma de uma amostra branco de referência, matriz sem adição do soluto. Após a dessorção, no tempo de retenção dos fármacos, não foi observado sinal analítico superior a 20% do ruído da linha de base.

Em nossos estudos a dessorção térmica SPME/GC²¹ foi realizada com a inserção da fibra no *liner* do injetor GC, modo *split*, no intervalo de tempo de 4 a 10 min e temperatura do injetor de 250°C. Já para análises SPME/LC, o processo de dessorção foi realizado em fase líquida, sistema *off-line*. Neste modo, a fibra SPME foi inserida em microtubo cônico, contendo alguns µL de fase líquida (fase móvel ou solvente orgânico) e os solutos foram dessorvidos com ou sem agitação (magnética ou sonicação) e controle de temperatura. Uma pequena alíquota do extrato obtido foi injetada (injetor convencional) no LC^{31,34,40}.

A interferência das proteínas do plasma na eficiência do processo SPME foi também avaliada. As proteínas, compostos de alta massa molar, podem adsorver de forma irreversível às fibras, diminuindo a capacidade extratora da fase e o tempo de uso destas. A diluição das amostras de plasma com solução tampão, em valor de pH adequado, minimizou a interferência das proteínas, ou seja, diminuiu a viscosidade do plasma e aumentou o coeficiente de difusão dos fármacos, favorecendo a eficácia do processo SPME.

As extrações SPME/GC-TSD de amitraz em amostras de plasma canino apresentaram taxas de recuperação 40-50% menores que às obtidas em amostras de água, demonstrando a influência das proteínas no processo SPME²¹.

Em nossos ensaios, a solução do padrão interno, preparada em metanol, foi adicionada às amostras de plasma, anterior ao processo de extração. A adição deste pequeno volume de metanol, provavelmente, favoreceu a precipitação de proteínas no frasco cônico de extração.

6. Validação analítica

As taxas de recuperação dos métodos DI-SPME, padronizados para análises de fármacos em fluidos biológicos^{21,31,34,40}, geralmente, foram inferiores a 20%. No entanto, este fato não implica em exatidão, linearidade e precisão analítica não satisfatórios. Para as determinações quantitativas, as curvas analíticas foram preparadas com amostras de plasma branco de referência enriquecidas com soluções padrão dos solutos em diferentes concentrações. Desta forma, os calibradores da curva analítica apresentaram taxas de recuperação iguais às das amostras de plasma dos pacientes.

As variações na eficiência do processo SPME, ou seja, nas taxas de recuperação dos fármacos, em razão de alterações, tais como: da composição endógena do plasma dos pacientes, das propriedades da fase extratora (diminuição da eficiência da fibra com o aumento do número de extrações) ou do procedimento analítico (variáveis SPME), têm sido compensadas com a adição do padrão interno (PI) às amostras, anterior ao processo de extração. A escolha adequada do PI é extremamente importante no desenvolvimento do método SPME. O PI requer estrutura química e propriedades físico-químicas similares aos solutos, para que durante as extrações este apresente coeficiente de sorção similar aos dos solutos.

A ANVISA, Resolução 899 de 29 de maio de 2003, preconiza porcentagens de recuperação do soluto e do padrão interno próximos a 100%, porém, admitem-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata⁴¹.

A técnica HS-SPME, quando aplicada para análise de voláteis, tem apresentado taxas de recuperação próximas a 100%³⁴.

A robustez das fibras, PDMS-DVB e CBW-DVB, foi confirmada após 40 extrações com perda mínima da eficiência da extração^{21,31,34,40}.

7. Considerações finais

A SPME, quando comparada aos métodos convencionais de extração, apresenta uma série de vantagens, tais como: a não utilização de solvente orgânico, integração da extração e da concentração do soluto em uma única etapa e em um dispositivo extrator (reutilizável) e introdução deste dispositivo no sistema analítico (SBSE/TD-GC) para o processo de desorção.

A técnica SPME/LC apresenta algumas limitações para análises de fármacos em fluidos biológicos, tais como: baixa estabilidade das fases extratoras na presença de solventes orgânicos ou em valores de pH extremos; número limitado de fases extratoras disponíveis no comércio, as quais são adequadas somente para a análise de compostos não iônicos; e adsorção irreversível dos compostos endógenos da matriz junto às fases extratoras, diminuindo a eficiência do processo de extração. Para minimizar estas dificuldades o uso de detectores mais seletivos ou de alta sensibilidade analítica, assim como modificações químicas da matriz biológica, tais como: o ajuste do pH, diluição da amostra e precipitação de proteínas têm sido realizados para aumentar a sensibilidade analítica do método padronizado.

A SPME, baseada no equilíbrio de sorção do soluto entre a fase extratora e amostra, concentra o soluto em alguns μL de fase extratora, geralmente, volumes menores que 0,5 μL . Desta forma, está técnica extrai apenas uma fração do soluto presente na amostra. As taxas de recuperação dos métodos DI-SPME, com fibras convencionais, padronizados para análises de fármacos em fluidos biológicos, geralmente, foram inferiores a 20%. No entanto, os métodos padronizados^{21,31,34,40} apresentaram exatidão, linearidade e precisão analíticas satisfatórias para fins de monitorização terapêutica.

8. Referências bibliográficas

1. H. Lord, J. Pawliszyn. *J. Chromatogr. A*, 902, 17 (2000).
2. S. Risticovic, V. H. Niri, D. Vuckovic, J. Pawliszyn. *Anal. Bioanal. Chem.*, 393, 781 (2009).
3. J. Pawliszyn (1999) In: *Applications of solid phase microextraction*. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
4. S. Ulrich. *J. Chromatogr. A*, 902, 167 (2000).
5. F. Pragst. *Anal. Bioanal. Chem.*, 388, 1393 (2007).
6. S. Ulrich, S. Kruggel, H. Weigmann, C. Hiemke. *J. Chromatogr. B*, 731, 231 (1999).
7. H. Lord. *J. Chromatogr. A*, 1152, 2 (2007).
8. M. Krogh, H. Grefslie, K. E. Rasmussen. *J. Chromatogr. B*, 689, 357 (1997).
9. M E C Queiroz, F M Lanças *LCGC North America*, 22, 970 (2004).
10. H. G. Ugland, M. Krogh., K.E. Rasmussen. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19, 463 (1999).
11. A. Namera, M. Yashiki, J. Liu, K. Okajima, I. Hara, T. Imamura, T. Kojima. *Forensic. Sci. Int.*, 109, 215 (2000).
12. G. Gmeiner, C. Krassnig, E. Schmid, H. Tausch. *J. Chromatogr B*, 705, 132 (1998).
13. A. M. Bermejo, R. Seara, M. J. Tebernero, P. Fernandez, R. Marsili. *J. Anal. Toxicol.*, 24, 66 (2000).
14. M. R. Lee, Y. S. Song, B. H. Hwang, C. Chou. *J. Chromatogr A*, 896, 265 (2000).
15. A. Namera, M. Yashiki, J. Liu, K. Okajima, I. Hara, T. Imamura, T. Kojima. *Forensic. Sci. Int.*, 109, 215 (2000).
16. U. Staerk, W. R. Kulpmann. *J. Chromatogr B*, 745, 399 (2000).
17. S. Kruggel, S. Ulrich. *Ther. Drug Monit.*, 22, 723 (2000).
18. G. Frison, L. Tedeschi, S. Maietti, S. D. Ferrara. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 15, 2497 (2001).
19. N. Fucci, N. De Giovanni, M. Chiarotti, S. Scarlata. *Forensic. Sci. Int.*, 119, 318 (2001).
20. M. Abdel-Rehim, Z. Hassan, L. Blomberg, M. Hassan. *Ther. Drug Monit.*, 25, 400, (2003).
21. M. E. C. Queiroz, C. A. A. Valadão, A. Farias, D. Carvalho, F. M. Lanças. *J Chromatogr. B*, 794, 337 (2003).
22. F. C. De Toledo, M. Yonamine, R. J. Moreau, A. O. Silva. *J. Chromatogr B.*, 811, 37 (2004).

23. C. Deng, W. Zhang, J. Zhang, X. Zhang. *J Chromatogr B*, 805, 235 (2004).
24. Y. Sha, C., Deng Z Lui, T. Huang, B. Yang, G. Duan. *J Chromatogr B*, 806, 271 (2004).
25. M. Walles, W. M. Mullet, J. Pawliszyn. *J. Chromatogr. A*, 1025, 85 (2004).
26. G. Theodoridis, M. A. Lontou, F. Michopoulos, M. Sucha, T. Gondova. *Anal. Chim Acta*, 516, 197 (2004).
27. C. Deng, X. Zhang, N. Li. *J. Chromatogr. B*, 808, 269 (2004).
28. H. Tsoukali, G. Theodoridis, N. Raikos, I. Grigoratou. *J Chromatogr B.*, 822, 194 (2005).
29. C. Deng, N. Li, J. Ji, B Yang, G. Duan, X. Zhang. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 20, 1281 (2006).
30. E. Gallardo, M. Barroso, C. Margalho, A. Cruz, D. N. Vieira, M. López-Rivadulla. *Anal Bioanal Chem.*, 386, 1717 (2006).
31. M. D. Cantú, D. R. Toso, C. A. Lacerda, F. M. Lanças, E. Carrilho, M. E. C. Queiroz. *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 256 (2006).
32. N. Li, C. Deng, X. Zhang. *J. Sep. Sci.*, 30, 266 (2007).
33. H. Lord, M. Rajabi, S. Safaris, J Pawliszyn. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 44, 506 (2007).
34. B. J. G. Silva, R. H. C. Queiroz, M. E. C. Queiroz. *J Anal Toxicol*, 31, 313 (2007).
35. A. Aresta, C. D. Calvano, F. Palmisano, C. G. Zambonin. *J Pharm Biomed Anal.*, 47, 641 (2008).
36. F. M. Musteata, I. Lannoy, B. Gien, J. Pawliszyn. *J. Pharm. Biomed Anal.*, 47, 907 (2008).
37. Y. Lui, S. Muralidhara, J. V. Bruckner, M. G. Bartlett. *J. Chromatogr. B.*, 863, 26 (2008).
38. N. Raikos, G. Theodoridis, E. Alexiadou, H. Gika, H. Argiriadou, H. Parlapani, H. Tsoukali. *J. Sep. Sci.*, 32, 1018 (2009).
39. V. S. Wang, M. Y. Lu. *J. Chromatogr. B*, 877, 24 (2009).
40. A. R. Chaves, G. Chiericato Júnior, M. E. C. Queiroz. *J Chromatogr B*, 877, 587 (2009).
41. ANVISA, Resolução 899 de 29 de maio de 2003.