

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Millena Christie Ferreira Avelar

**Emprego da eletroextração multifásica para extração de
antidepressivos tricíclicos em fluido oral e determinação por
UHPLC-MS/MS e PS-MS**

Belo Horizonte

2020

UFMG/ICEX/DQ. 1392
D. 760

Millena Christie Ferreira Avelar

Emprego da eletroextração multifásica para extração de antidepressivos tricíclicos em fluido oral e determinação por UHPLC-MS/MS e PS-MS

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química – Química Analítica.

Orientador: Ricardo Mathias Orlando

Coorientadora: Clésia Cristina Nascentes

Belo Horizonte

2020

Ficha Catalográfica

A948e Avelar, Millena Christie Ferreira
2020 Emprego da eletroextração multifásica para extração
D de antidepressivos tricíclicos em fluido oral e
determinação por UHPLC-MS/MS e PS-MS [manuscrito] /
Millena Christie Ferreira Avelar. 2020.
[xx], 99 f. : il.

Orientador: Ricardo Mathias Orlando.
Coorientadora: Clésia Cristina Nascentes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses. 2. Cromatografia
líquida de alta eficiência - Teses. 3. Espectrometria
de massa - Teses. 4. Saliva - Exame - Teses. 5.
Antidepressivos - Teses. 6. Preparação de amostra
(Química) - Teses. I. Orlando, Ricardo Mathias,
Orientador. II. Nascentes, Clésia Cristina,
Coorientadora. III. Título.

CDU 043

"Emprego da Eletroextração Multifásica para Extração de Antidepressivos Tricíclicos em Fluido Oral e Determinação por UHPLC-MS/MS e PS-MS"

Millena Christie Ferreira Avelar

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Ricardo Mathias Orlando

Prof. Ricardo Mathias Orlando - Orientador
UFMG

Clésia Cristina Nascentes

Profa. Clésia Cristina Nascentes - Coorientadora
UFMG

Adriana Nori de Macedo

Profa. Adriana Nori de Macedo
UFMG

Mariana Ramos de Almeida

Profa. Mariana Ramos de Almeida
UFMG

Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

A Deus, nosso criador, Pai e Senhor, de onde me vem todo o sustento. A ti seja a glória eternamente!

A minha família e familiares, pelo amor e apoio incondicionais, em especial aos meus pais Salete e Reginaldo e ao meu irmão Patrick.

A minha amiga irmã Tarlene, pelo companheirismo constante desde a graduação. Sua amizade tornou o fardo mais leve durante todos esses anos!

Ao meu orientador Ricardo, pelos ensinamentos, confiança, paciência, incentivos, disponibilidade e sobretudo pela amizade desde a iniciação científica. Que você continue apaixonado pelo que faz!

A minha coorientadora Clésia, pelos ensinamentos, confiança, disponibilidade e parceria nesse trabalho.

Aos colegas do LaMS, laboratório mais eletrizado do DQ, pela alegria, parceria e boa convivência. São eles: SoberAna (Ana Fugêncio), Bruna Samara, professor Bruno Botelho, Meu LC minha vida (Daphne Antônio), Maria (Denise Versiane), Jimmy (Glaucimar Rezende), Hebert Vinícius, Jaime Viana, DJXúlia (Júlia Condé), Keila Heringer, Mariana de PL (Mariana Diniz), Marden Claret, Orçamento (Matheus Quintão), Tarlene Pinheiro, Torugo (Victor Boratto), Vivi (Victoria Amador) e Will (Willian Miguel). De mim cês tão livre! Hahaha.

À Marina Caneshi pela amizade e aventuras no UPLC-MS/MS.

Aos colegas do LEMB e do LEAQuAA pela colaboração.

Ao professor Ruben Millán, por conceder o uso do equipamento UPLC-MS/MS.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida. E ao CNPq e ao INCTAA pelo auxílio à pesquisa.

Ao programa de pós-graduação em Química da UFMG pela oportunidade.

Às professoras Adriana Nori e Mariana Ramos pelas gentis contribuições.

E a todos que, como o 'seu' Luiz Bazilio com seus sorrisos de bom dia, contribuíram de alguma forma para que esse trabalho viesse a ser realizado.

“Louvai ao Senhor, todas as nações; glorificai-o todos os povos. Pois grande é o seu amor para conosco, e a fidelidade do Senhor dura para sempre. Louvai ao Senhor.”

(Salmos 117)

RESUMO

Os antidepressivos tricíclicos (TCAs) são substâncias usadas para o tratamento de distúrbios de ansiedade e depressão. E apesar de sua eficácia, apresentam muitos efeitos colaterais. Devido a isso e também à janela terapêutica estreita desses fármacos faz-se necessário a sua determinação em amostras biológicas. Para isso, um sistema multiposos de eletroextração (EE) multifases foi empregado para extração dos TCAs: doxepina, imipramina, amitriptilina, nortriptilina e clomipramina em fluido oral. Em seguida, o extrato obtido foi analisado por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS) além da espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS). A influência do campo elétrico na extração foi avaliada, sendo esse um fator crucial para uma boa recuperação dos TCAs. Os analitos foram extraídos de uma solução doadora composta pela amostra e acetonitrila 1:1 (v/v), migrando através de uma membrana livre de 1-octanol, chegando à fase aceptora. Essa última foi constituída de papel cromatográfico embebido em ácido acético 400 mmol L⁻¹ possuindo uma ponta triangular propícia para técnica de PS-MS. Estudos univariados foram realizados para otimização dos parâmetros de preparo de amostra: tipo de solvente de dessorção dos analitos, tipos de papel e de eletrólito usados na fase aceptora, solvente orgânico usado como filtro, presença de carreador no filtro orgânico e tipo de solvente orgânico na fase doadora. Uma otimização multivariada também foi realizada para avaliação do tempo de extração, diferença de potencial elétrico e percentual de solvente orgânico na fase doadora. Após otimização, o percentual de extração alcançado para cada um dos analitos foi cerca de 55% com um tempo de extração de 10 minutos a 300 V e percentual de acetonitrila de 50% (v/v). O método EE-UHPLC-MS/MS otimizado foi validado na faixa de concentração de TCAs de 2 a 12 ng mL⁻¹, com LD de 0,13 a 0,25 ng mL⁻¹ e LQ de 0,44 a 0,84 ng mL⁻¹. A precisão e exatidão foram avaliadas em três níveis de concentração (2, 6 e 10 ng mL⁻¹) alcançando coeficientes de variação menores que 26% e recuperações maiores que 75%. O método validado foi aplicado a amostras reais de fluido oral fortificadas, e os resultados tiveram baixa variação entre as amostras de diferentes voluntários. O método mostrou-se seletivo e ausente de efeito matriz. Uma nova configuração para a eletroextração foi realizada a fim de reduzir fontes de variação no posicionamento das fases aceptoras e ainda ser facilmente acoplada à espectrometria de massas com ionização por *paper spray*. Nessa configuração o percentual de extração de TCAs foi de 35% e os coeficientes de variação para a análise por PS-MS foram menores que 20%.

Palavras-chave: TCAs, Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial, *Paper spray*, Eletroextração, Saliva.

ABSTRACT

Tricyclic antidepressants (TCAs) are substances used for the treatment of anxiety disorders and depression. And despite its effectiveness, have many side effects. Due to this and also to narrow therapeutic window of these drugs it is necessary to its determination in biological samples. For this reason, a multiphase multiwell plate for electroextraction was employed to extract the tricyclic antidepressants: doxepin, imipramine, amitriptyline, nortriptyline, and clomipramine from oral fluid. Afterwards the extract was analyzed by ultra-high liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) and also by paper spray mass spectrometry analysis. The effect of electric field in the extraction was evaluated since it is a crucial factor to achieve good recovery of TCAs. The analytes were extracted from donor solution consisted of a mixture of a sample and acetonitrile 1:1 (v/v), across the free liquid membrane made of 1-octanol, arriving in the acceptor phase. This last one was constituted of chromatographic paper embedded in acetic acid 400 mmol L⁻¹ with a triangular tip suitable to PS-MS technique. Univariate studies were carried out to optimize the parameters: desorption of analytes from acceptor phase, chromatography paper and electrolyte types used in the acceptor phase, the organic solvent used as organic filter, presence of carrier on the organic filter and organic solvent type used in the donor phase. A multivariate optimization was performed to evaluate the extraction time, applied electric potential difference and the solvent percentage in the donor phase. After optimization, extraction efficiency was about 55% with 10 minutes of extraction at 300 V and 50% (v/v) of acetonitrile in the donor phase. The optimized EE-UHPLC-MS/MS method was validated in the range 2 – 12 ng mL⁻¹ to TCAs, with LD was 0,13 to 0,25 and LQ was 0,44 to 0,84. The precision and accuracy were assessed at three concentration levels (2, 6 and 10 ng mL) with relative standard deviations under 26% and recovery higher than 75%. The method validated was applied to real fortified samples with low variation among different sample sources. The method was selective and unaffected by matrix effect. A new electroextraction configuration has been tested in an attempt to reduce variation sources on the paper position of the acceptor phase and to easily and directly couple electroextraction to paper spray mass spectrometry. Using this system, the extraction efficiency was about 35%. And the relative standard deviations were lower than 20% in the analysis by PS-MS.

Key-words: TCAs, Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, Paper spray, Electroextraction, Saliva.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura molecular, ^a $-\log$ da constante de acidez³⁸ e ^b coeficiente de partição octanol/ água³⁹ dos TCAs: doxepina, imipramina, amitriptilina, nortriptilina e clomipramina..... 4
- Figura 2.** Representações do sistema de (a) eletroextração em membrana e de (b) eletroextração trifásica. Adaptadas de Pedersen-Bjergaard e Rasmussen²² e Raterink *et al.*²⁹ respectivamente. Polos elétricos representados para extração de analitos catiônicos. 10
- Figura 3.** Representação do sistema de eletroextração multifases com a fase acceptora constituída de eletrólito suportado em cone odontológico. Adaptado de Orlando *et al.*³¹ Polos elétricos representados para extração de analitos catiônicos. 11
- Figura 4.** Gradiente de injeção usado na análise de TCAs por UHPLC-MS/MS. 18
- Figura 5.** Sistema multipoços de eletroextração. (Os sinais dos polos elétricos como estão mostrados referem-se às extrações dos analitos antidepressivos que se encontravam predominantemente catiônicos). 23
- Figura 6.** Representação simplificada do sistema de eletroextração. Polos elétricos representados para extração de analitos catiônicos. 24
- Figura 7.** Representação do sistema de eletroextração usando a configuração da fase acceptora suportada em um recipiente tubular. Polos elétricos representados para extração de analitos catiônicos..... 33
- Figura 8.** Foto com visão superior da montagem da fonte de ionização por *paper spray* em (a). Visão lateral da posição da fase acceptora suportada em frente à entrada do espectrômetro de massas em (b). 34
- Figura 9.** Gráfico de Pareto para a doxepina. (1) = energia de colisão/ V, (2) = voltagem do cone/ V, (3) = voltagem do capilar/ kV, (4) = temperatura da fonte/ °C, (5) = temperatura de dessolvatação/ °C, (6) = vazão do gás de dessolvatação/ L h⁻¹, (7) = vazão do gás do cone/ L h⁻¹, (8) = *high mass resolution 2*, (9) = *low mass resolution 1*, (10) *Ion energy 1*, (11) = *high mass resolution 2*, (12) = *low mass 2 resolution 2*, (13) = *Ion energy 2*. 35
- Figura 10.** Gráfico de Pareto para a imipramina. (1) = energia de colisão/ V, (2) = voltagem do cone/ V, (3) = voltagem do capilar/ kV, (4) = temperatura da fonte/ °C, (5) = temperatura de dessolvatação/ °C, (6) = vazão do gás de dessolvatação/ L h⁻¹, (7) = vazão do gás do cone/ L h⁻¹, (8) = *high mass resolution 2*, (9) = *low mass resolution 1*, (10) *Ion energy 1*, (11) = *high mass resolution 2*, (12) = *low mass 2 resolution 2*, (13) = *Ion energy 2*. 36

- Figura 11.** Gráfico de Pareto para a amitriptilina. (1) = energia de colisão/ V, (2) = voltagem do cone/ V, (3) = voltagem do capilar/ kV, (4) = temperatura da fonte/ °C, (5) = temperatura de dessolvatação/ °C, (6) = vazão do gás de dessolvatação/ L h⁻¹, (7) = vazão do gás do cone/ L h⁻¹, (8) = *high mass resolution 2*, (9) = *low mass resolution 1*, (10) *Ion energy 1*, (11) = *high mass resolution 2*, (12) = *low mass 2 resolution 2*, (13) = *Ion energy 2*. 36
- Figura 12.** Gráfico de Pareto para a nortriptilina. (1) = energia de colisão/ V, (2) = voltagem do cone/ V, (3) = voltagem do capilar/ kV, (4) = temperatura da fonte/ °C, (5) = temperatura de dessolvatação/ °C, (6) = vazão do gás de dessolvatação/ L h⁻¹, (7) = vazão do gás do cone/ L h⁻¹, (8) = *high mass resolution 2*, (9) = *low mass resolution 1*, (10) *Ion energy 1*, (11) = *high mass resolution 2*, (12) = *low mass 2 resolution 2*, (13) = *Ion energy 2*. 37
- Figura 13.** Gráfico de Pareto para a clomipramina. (1) = energia de colisão/ V, (2) = voltagem do cone/ V, (3) = voltagem do capilar/ kV, (4) = temperatura da fonte/ °C, (5) = temperatura de dessolvatação/ °C, (6) = vazão do gás de dessolvatação/ L h⁻¹, (7) = vazão do gás do cone/ L h⁻¹, (8) = *high mass resolution 2*, (9) = *low mass resolution 1*, (10) *Ion energy 1*, (11) = *high mass resolution 2*, (12) = *low mass 2 resolution 2*, (13) = *Ion energy 2*. 37
- Figura 14.** Superfície de resposta e mapa de contorno para a doxepina obtidos pelo planejamento Doehlert dos fatores voltagem do capilar e temperatura de dessolvatação. 40
- Figura 15.** Superfície de resposta e mapa de contorno para a imipramina obtidos pelo planejamento Doehlert dos fatores voltagem do capilar e temperatura de dessolvatação. 41
- Figura 16.** Superfície de resposta e mapa de contorno para a amitriptilina obtidos pelo planejamento Doehlert dos fatores voltagem do capilar e temperatura de dessolvatação. 41
- Figura 17.** Superfície de resposta e mapa de contorno para a nortriptilina obtidos pelo planejamento Doehlert dos fatores voltagem do capilar e temperatura de dessolvatação. 42
- Figura 18.** Superfície de resposta e mapa de contorno para a clomipramina obtidos pelo planejamento Doehlert dos fatores voltagem do capilar e temperatura de dessolvatação. 42
- Figura 19.** Foto de parte do sistema de eletroextração após a extração de corante violeta genciana. Condições: diferença de potencial elétrico de 300 V durante 3 min; fase doadora composta por 1 mL de VG (2 mg L⁻¹) em tampão McIlvaine pH 3: acetonitrila 1:1 (v/v); filtro orgânico composto por 750 µL de 1-octanol; fase aceptora constituída de papel cromatográfico 3MM Chr embebido com 70 µL de ácido acético 400 mmol L⁻¹ (n = 3). 46

- Figura 20.** Percentual de extração de TCAs frente às misturas de solventes de dessorção. Solventes: MeOH = metanol, HAc = ácido acético, ACN = acetonitrila, THF = tetrahidrofurano, NaAc = acetato de sódio, NH₄Ac = acetato de amônio. Volume de solvente: 0,55 mL. Tempo de dessorção: 30 segundos (vórtex, 2000 rpm), 5 min (ultrassom) (n = 3). 47
- Figura 21.** Influência do campo elétrico na distribuição dos TCAs nas fases (a) acceptora, (b) filtro orgânico e (c) fase doadora do sistema. Condições: diferença de potencial de 300 V durante 10 min; fase doadora composta de 1 mL de TCAs 0,5 µg mL⁻¹ em NH₄Ac 50 mmol L⁻¹: ACN 1:1 (v/v); filtro orgânico formado por 750 µL de 1-octanol; fase acceptora representada por papel cromatográfico 1 Chr embebido com 70 µL de HAc 400 mmol L⁻¹ (n = 3). 50
- Figura 22.** Comparação entre o tampão NH₄Ac 50 mmol L⁻¹ e a saliva artificial empregados na fase doadora na distribuição de TCAs nas fases (a) acceptora, (b) filtro orgânico e (c) fase doadora do sistema. Condições: diferença 300 V, tempo: 10 min, fase doadora: 1 mL de TCAs 0,5 µg mL⁻¹ em NH₄Ac 50 mmol L⁻¹ (ou saliva artificial): ACN 1:1 v/v, filtro: 750 µL de 1-octanol, fase acceptora: papel cromatográfico 3MM Chr embebido com 70 µL de HAc 400 mmol L⁻¹(n = 3). 52
- Figura 23.** Efeito do eletrólito da fase acceptora na distribuição dos TCAs nas fases (a) acceptora, (b) filtro orgânico e (c) fase doadora do sistema. Condições: diferença de potencial elétrico de 300 V durante 10 min; fase doadora composta de 1 mL de TCAs 0,5 µg mL⁻¹ em NH₄Ac 50 mmol L⁻¹: ACN 1:1 (v/v); filtro orgânico formado de 750 µL de 1-octanol; fase acceptora constituída de papel cromatográfico 1 Chr embebido com 70 µL de HAc 400 mmol L⁻¹ ou HCOOH 400 mmol L⁻¹ ou HCl 10 mmol L⁻¹ (n = 3). 53
- Figura 24.** Influência do suporte da fase acceptora na distribuição de TCAs nas fases (a) acceptora, (b) filtro orgânico e (c) fase doadora do sistema. Condições: diferença de potencial elétrico de 300 V e tempo de 10 min; fase doadora composta por 1 mL de TCAs 0,5 µg mL⁻¹ em NH₄Ac 50 mmol L⁻¹: ACN 1:1 (v/v); filtro orgânico constituído de 750 µL de 1-octanol; fase acceptora composta por papel cromatográfico 1 Chr ou 3MM Chr embebidos com 70 µL de HAc 400 mmol L⁻¹ (n = 3). 55
- Figura 25.** Influência do solvente orgânico presente na fase doadora na distribuição de TCAs nas fases (a) acceptora, (b) filtro orgânico e (c) fase doadora do sistema. Condições: diferença de potencial elétrico 300 V aplicado por 10 min; fase doadora composta por 1 mL de TCAs 0,5 µg mL⁻¹ em NH₄Ac 50 mmol L⁻¹: ACN (ou MeOH, EtOH) 1:1 (v/v); filtro orgânico constituído de 750 µL de 1-octanol; fase acceptora composta por papel cromatográfico 3 MM Chr embebido com 70 µL de HAc 400 mmol L⁻¹. ACN = acetonitrila; MeOH = metanol; EtOH = etanol (n = 3). 56
- Figura 26.** Estrutura molecular do TEPH, do DEPH e da curcumina 58
- Figura 27.** Influência da presença de curcumina no filtro orgânico na distribuição de TCAs nas fases (a) acceptora, (b) filtro orgânico e (c) fase doadora do sistema. Condições:

diferença de potencial aplicado 300 V durante 10 min; fase doadora composta por 1 mL de TCAs $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ em NH_4Ac 50 mmol L^{-1} ; ACN 1:1 (v/v); filtro orgânico constituído de 750 μL de 1-octanol (ou com curcumina 0,1% m/v); fase aceptora composta por papel cromatográfico 3MM Chr embebido com 70 μL de HAc 400 mmol L^{-1} . s/ curc = sem curcumina; c/ curc = com curcumina (n = 3). 59

- Figura 28.** Mapa de contorno da função desejabilidade para otimização da composição do filtro orgânico..... 61
- Figura 29.** Influência da precipitação de proteína na recuperação de TCAs no sistema de eletroextração avaliada na (a) fase aceptora e (b) no filtro orgânico do sistema. Condições: diferença de potencial de 300 V aplicado durante 10 min; fase doadora composta por 1 mL de TCAs $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ em saliva real: ACN 1:1 (v/v); filtro orgânico constituído de 750 μL de 1-octanol; fase aceptora composta por papel cromatográfico 3MM Chr embebido com 70 μL de HAc 400 mmol L^{-1} . SR = saliva real; PP = precipitação proteica (n = 3). 63
- Figura 30.** Mapa de contorno da função desejabilidade para otimização da eletroextração relacionando tempo e potencial. A variável percentual de orgânico na fase doadora foi mantida no nível mais alto (50% v/v). 65
- Figura 31.** Cromatogramas de TCAs a 12 ng mL^{-1} e do branco no modo MRM obtidos após a extração e análise no UPLC-MS/MS. 67
- Figura 32.** Curvas de doxepina construídas no extrato das matrizes de saliva real e artificial e em solvente (MeOH: ACN: HAc 47,5: 47,5: 5 v/v/v) (n = 3). 68
- Figura 33.** Curvas de imipramina construídas no extrato das matrizes de saliva real e artificial e em solvente (MeOH: ACN: HAc 47,5: 47,5: 5 v/v/v) (n = 3). 68
- Figura 34.** Curvas de amitriptilina construídas em extrato das matrizes de saliva real e artificial e em solvente (MeOH: ACN: HAc 47,5: 47,5: 5 v/v/v) (n = 3). 69
- Figura 35.** Curvas de nortriptilina construídas em extrato das matrizes de saliva real e artificial e em solvente (MeOH: ACN: HAc 47,5: 47,5: 5 v/v/v) (n = 3). 69
- Figura 36.** Curvas de clomipramina construídas em extrato das matrizes de saliva real e artificial e em solvente (MeOH: ACN: HAc 47,5: 47,5: 5 v/v/v) (n = 3). 69
- Figura 37.** Eficiência de extração para amostras de saliva artificial fortificadas com TCAs nas concentrações de 2, 6 e 10 ng mL^{-1} . Condições: diferença de potencial de 300 V durante 10 min, fase doadora composta por 1 mL de TCAs 6 ng mL^{-1} em saliva artificial e ACN 1:1 (v/v); filtro orgânico formado por 750 μL de 1-octanol; fase aceptora constituída de papel cromatográfico 3MM Chr embebido com 70 μL de HAc 400 mmol L^{-1} (n = 6). 73
- Figura 38.** Sinal analítico normalizado de TCAs extraídos de 10 amostras diferentes de saliva real. Condições: diferença de potencial elétrico de 300 V durante 10 min; fase doadora composta por 1 mL de TCAs 6 ng mL^{-1} em saliva real e ACN 1:1 (v/v); filtro

orgânico constituído de 750 μL de 1-octanol; fase aceptora representada por papel cromatográfico 3MM Chr embebido com 70 μL de HAc 400 mmol L^{-1} ($n = 3$)..... 74

Figura 39. Foto da fase aceptora suportada após a extração do corante violeta genciana. 75

Figura 40. Estrutura molecular da ciclobenzaprina..... 76

Figura 41. Razão do sinal de TCAs e do padrão interno (ciclobenzaprina) na análise por PS-MS. Condições: diferença de potencial de 300 V durante 10 min, fase doadora composta por 1 mL de TCAs e CBZ a 2 mg mL^{-1} em saliva artificial e ACN 1:1 (v/v); filtro orgânico formado por 750 μL de 1-octanol; fase aceptora constituída de papel cromatográfico 3MM Chr embebido com 70 μL de HAc 400 mmol L^{-1} suportada em uma ponta de ponteira ($n = 3$). 76

Figura 42. Perfil de corrente para extração de TCAs nas configurações do papel livre e suportado. Condições: diferença de potencial elétrico de 300 V durante 10 min; fase doadora composta por 1 mL de TCAs 12 ng mL^{-1} em saliva artificial: ACN 1:1 (v/v); filtro orgânico constituído de 750 μL de 1-octanol; fase aceptora composta por papel cromatográfico 3MM Chr embebido com HAc 400 mmol L^{-1} 77

Figura 43. Superfície de resposta para a doxepina. 90

Figura 44. Superfície de resposta para a imipramina 91

Figura 45. Superfície de resposta para amitriptilina 92

Figura 46. Superfície de resposta para a nortriptilina. 93

Figura 47. Superfície de resposta para a clomipramina. 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Revisão dos métodos de determinação de antidepressivos tricíclicos em amostras biológicas nos últimos 5 anos baseados em técnicas analíticas de separação.	8
Tabela 2. Trabalhos publicados a respeito da eletroextração em membrana contemplando antidepressivos tricíclicos.....	15
Tabela 3. Transições, energias de colisão e voltagens do cone para os analitos.	19
Tabela 4. Níveis inferior e superior das 13 variáveis estudadas no planejamento fatorial fracionário 2_{III}^{13-9} para os cinco analitos.	20
Tabela 5. Níveis das variáveis temperatura de dessorção e voltagem do capilar para o planejamento Doehlert.	21
Tabela 6. Níveis das variáveis energia de colisão (EC) e voltagem do cone (VC) para o planejamento Doehlert.	21
Tabela 7. Configuração do planejamento de misturas rede simplex de 3 componentes para otimização da composição do filtro orgânico para a extração de TCAs.	27
Tabela 8. Níveis das variáveis potencial elétrico, tempo e percentual de orgânico avaliados no planejamento Box-Behnken para otimização da eletroextração de TCAs.....	28
Tabela 9. Valores das variáveis potencial elétrico, tempo e percentual de solvente orgânico na fase doadora (% Org FD) para os 13 experimentos do planejamento Box-Behnken para a otimização da eletroextração de TCAs.	28
Tabela 10. Parâmetros de análise de TCAs por PS-MS.	33
Tabela 11. Valores adotados para as condições de análise no espectrômetro de massas após o planejamento fracionário 2_{III}^{13-9}	38
Tabela 12. Parâmetros da ANOVA para o modelo ajustado dos parâmetros da fonte de ionização do espectrômetro de massas. Nível de confiança de 95%.....	39
Tabela 13. Valores dos coeficientes estimados para o modelo ajustado dos parâmetros da fonte de ionização do espectrômetro de massas. Nível de confiança de 95%.	40
Tabela 14. Parâmetros da ANOVA para o modelo ajustado dos parâmetros energia de colisão e voltagem do cone. Nível de confiança de 95%.	43
Tabela 15. Valores de energia de colisão (EC) e voltagem do cone (VC) adotados para os antidepressivos tricíclicos.....	44
Tabela 16. Valores adotados para os parâmetros de análise no espectrômetro de massas.	45

Tabela 17. Parâmetros da ANOVA para os modelos ajustados na otimização da composição do filtro orgânico para extração de TCAs. Nível de confiança de 95%.....	60
Tabela 18. Coeficientes do modelo ajustado para a otimização da composição do filtro orgânico. Nível de confiança de 95%.	61
Tabela 19. Parâmetros da ANOVA do modelo ajustado para a otimização do tempo, diferença de potencial elétrico e porcentagem de solvente orgânico na fase doadora para a extração de TCAs. Nível de confiança de 95%.....	64
Tabela 20. Coeficientes do modelo ajustado na otimização das condições de eletroextração. Nível de confiança de 95%.....	64
Tabela 21. Equações da reta e coeficientes de determinação para a curva extraída de TCAs (n = 3).....	70
Tabela 22. Limites de detecção e quantificação de TCAs para o método EE-UHPLC-MS/MS (n = 10).....	70
Tabela 23. Valores de precisão intra e interdias para a determinação de TCAs, em três níveis de concentração, por EE-UHPLC-MS/MS (n = 6).....	71
Tabela 24. Valores de recuperação de TCAs em três níveis de concentração, pelo método EE-UHPLC-MS/MS (n = 6).....	72
Tabela 25. Parâmetros da ANOVA para a doxepina.....	88
Tabela 26. Parâmetros da ANOVA para a imipramina.....	88
Tabela 27. Parâmetros ANOVA para a amitriptilina.	89
Tabela 28. Parâmetros ANOVA para a nortriptilina.....	89
Tabela 29. Parâmetros da ANOVA para a clomipramina.....	89
Tabela 30. Parâmetros da ANOVA para a doxepina.....	90
Tabela 31. Parâmetros da ANOVA para a imipramina.....	91
Tabela 32. Parâmetros da ANOVA para a amitriptilina.	92
Tabela 33. Parâmetros da ANOVA para a nortriptilina.....	93
Tabela 34. Parâmetros da ANOVA para a clomipramina.....	94
Tabela 35. Parâmetros da ANOVA para a doxepina.....	95
Tabela 36. Parâmetros da ANOVA para a imipramina.....	95
Tabela 37. Parâmetros da ANOVA para a amitriptilina.	96
Tabela 38. Parâmetros da ANOVA para a nortriptilina.....	96
Tabela 39. Parâmetros da ANOVA para a clomipramina.....	96

Tabela 40. Parâmetros da ANOVA para a doxepina.....	97
Tabela 41. Parâmetros da ANOVA para a imipramina.....	98
Tabela 42. Parâmetros da ANOVA para a amitriptilina.....	98
Tabela 43. Parâmetros da ANOVA para a nortriptilina.....	99
Tabela 44. Parâmetros da ANOVA para a clomipramina.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS

AA-DES-LPME	<i>Air assisted liquid phase microextracion deep euthetic solvent</i>
AALLME	Microextração líquido-líquido assistida por ar (<i>air assisted liquid-liquid microextraction</i>)
ACN	Acetonitrila
AMI	Amitriptilina
ANOVA	Análise de variância
CBZ	Ciclobenzaprina
C/ curc	Com curcumina
CE-PDA	Eletroforese capilar com detector de arranjo de fotodiodos (<i>capillary electrophoresis with photodiodes array detection</i>)
CLO	Clomipramina
CLPME	Microextração em fase líquida contínua (<i>continuous liquid phase microextraction</i>)
CV	Coeficiente de variação
DEPH	Di (2-etilhexil) fosfato
DLLME-SFO	Microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante (<i>dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of a floating organic drop</i>)
D _μ SPE-CAE	<i>Dispersive micro solid phase extraction combined with coacervative extraction</i>
DSPE	Extração em fase sólida dispersiva (<i>dispersive solid phase extraction</i>)
DOX	Doxepina
EA-DM- _μ SPE	<i>Effervescent salt-assisted dispersive magnetic micro solid phase extraction</i>
EC-SPME	Microextração em fase sólida eletroquimicamente controlada (<i>electrochemically controled solid phase microextraction</i>)
EE	Eletroextração
EME	Eletroextração em membrana (<i>electromembrane extraction</i>)
EMI	<i>Electromembrane isolation</i>
ENB	1-etil-2-nitrobenzeno
2-ETH	2-etil-1-hexanol

EtOH	Etanol
FA	Fase aceptora
F_{calc}	Valor de F calculado para o teste de Fisher-Snedecor
FD	Fase doadora
FDE	<i>Filter based dual emulsification</i>
FLM	Membrana líquida livre (<i>free liquid membrane</i>)
FO	Filtro orgânico
FPSE	<i>Fabric phase sorptive extraction</i>
F_{tab}	Valor de F tabelado para o teste de Fisher-Snedecor
GC-FID	Cromatografia gasosa com ionização por chama (<i>gas chromatography flame-ionization detection</i>)
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (<i>gas chromatography mass spectrometry</i>)
HAc	Ácido acético
HF-DDSME	<i>Hollow fiber drop-to-drop solvent microextraction</i>
HF-LPME	Microextração em fase líquida com fibra oca (<i>hollow-fiber liquid-phase microextraction</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IMI	Imipramina
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (<i>liquid chromatography mass spectrometry</i>)
LC-RRS	Cromatografia líquida acoplada com detector de espalhamento Rayleigh (<i>liquid chromatography with resonance Rayleigh scattering</i>)
LC-UV	Cromatografia líquida com detector ultravioleta-visível (<i>liquid chromatography ultraviolet-visible</i>)
LLE	Extração líquido-líquido (<i>Liquid-liquid extraction</i>)
LLME	Microextração líquido-líquido (<i>Liquid-liquid microextraction</i>)
MAOIs	Inibidores da monoamina oxidase (<i>monoamine oxidase inhibitor</i>)
MeOH	Metanol
MRM	Monitoramento de reações múltiplas (<i>multiple reaction monitoring</i>)
MSPE	Extração em fase sólida magnética (<i>magnetic solid phase extraction</i>)

μ SPE	Micro extração em fase sólida (<i>microextraction solid phase</i>)
NaAc	Acetato de sódio
NH ₄ Ac	Acetato de amônio
NOR	Nortriptilina
NPOE	2-nitrofenil octiléter
OMS	Organização Mundial da Saúde
PD1	Planejamento Doehlert 1
PD2	Planejamento Doehlert 2
PP	Precipitação proteica
PS-MS	Espectrometria de massas com ionização por paper spray (<i>paper spray mass spectrometry</i>)
Ref	Referências
RT	Tempo de retenção
S/ curc	Sem curcumina
SI-HLLE	Extração líquido-líquido homogênea por <i>salting out</i> (<i>salt induced homogeneous liquid-liquid extraction</i>)
SLM	Membrana líquida suportada (<i>supported liquid membrane</i>)
SPE	Extração em fase sólida (<i>solid phase extraction</i>)
SSRIs	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina (<i>selective serotonin reuptake inhibitors</i>)
SUPRAS-ME	Microextração baseada em solventes supramoleculares (<i>supramolecular solvents microextraction</i>)
TCAs	Antidepressivos tricíclicos (<i>tricyclic antidepressants</i>)
TEPH	Tris (2-etilhexil) fosfato
THF	Tetrahidrofurano
UHPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (<i>ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>)
VG	Violeta genciana

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Objetivo geral.....	3
1.2	Objetivos específicos.....	3
2	CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1	Antidepressivos tricíclicos.....	4
2.2	A saliva como matriz em bioanálises.....	6
2.3	Técnicas analíticas e de preparo de amostras para TCAs.....	7
2.3.1	Eletroextração.....	10
2.3.1.1	Fatores que afetam a eletroextração.....	11
2.3.1.2	Extração de TCAs por eletroextração em membrana.....	14
3	PARTE EXPERIMENTAL	16
3.1	Materiais e Reagentes.....	16
3.2	Equipamentos.....	16
3.3	Preparo das soluções utilizadas.....	17
3.3.1	Soluções estoque e trabalho dos analitos.....	17
3.3.2	Saliva artificial.....	17
3.3.3	Saliva real.....	17
3.3.4	Demais soluções.....	18
3.4	Condições cromatográficas e espectrométricas.....	18
3.5	Triagem das condições de análise no espectrômetro de massas através do planejamento fatorial fracionário 2_{III}^{13-9}	19
3.6	Otimização das condições de análise no espectrômetro de massas através do planejamento Doehlert.....	20
3.7	Procedimento geral para montagem do sistema de eletroextração.....	22
3.8	Avaliação do solvente de dessorção.....	24
3.9	Estudo univariado das condições que afetam a eletroextração.....	25
3.9.1	Efeito do campo elétrico: teste inicial.....	25
3.9.2	Comparação entre solução tampão e saliva artificial como fases doadoras.....	25
3.9.3	Efeito do eletrólito da fase aceptora.....	25
3.9.4	Efeito do tipo de papel da fase aceptora.....	25
3.9.5	Efeito do solvente orgânico presente na fase doadora.....	26

3.9.6	Efeito da presença de carreador no filtro orgânico	26
3.10	Estudo multivariado das condições que afetam a eletroextração	26
3.10.1	Planejamento de misturas para a otimização da composição do filtro orgânico	26
3.10.2	Efeito da precipitação proteica na recuperação de TCAs	27
3.10.3	Planejamento Box-Behnken para otimização das condições de eletroextração.....	27
3.11	Cálculo do percentual de analitos presentes em cada fase	29
3.12	Validação do método.....	29
3.12.1	Seletividade.....	29
3.12.2	Efeito matriz	30
3.12.3	Linearidade	30
3.12.4	Limites de detecção e quantificação	30
3.12.5	Precisão intra e interdias	31
3.12.6	Recuperação.....	31
3.12.7	Eficiência de extração	31
3.12.8	Comparação entre amostras de saliva de diferentes voluntários	32
3.13	Utilização da técnica de PS-MS como triagem para análise de TCAs em fluido oral	32
3.14	Perfil de corrente elétrica.....	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	Triagem das condições de análise no espectrômetro de massas através do planejamento fracionário 2_{III}^{13-9}	35
4.2	Otimização das condições de análise no espectrômetro de massas através do planejamento Doehlert.....	38
4.3	Prova de conceito para a eletroextração	45
4.4	Avaliação do solvente de dessorção	46
4.5	Estudo univariado das condições que afetam a eletroextração	48
4.5.1	Efeito do campo elétrico: teste inicial.....	49
4.5.2	Comparação entre solução tampão e saliva artificial como fases doadoras	50
4.5.3	Efeito do eletrólito da fase aceptora	52
4.5.4	Efeito do tipo de papel da fase aceptora.....	54
4.5.5	Efeito do solvente orgânico presente na fase doadora	55
4.5.6	Efeito da presença de carreador (curcumina) no filtro orgânico.....	57
4.6	Estudo multivariado das condições que afetam a eletroextração	59

4.6.1	Planejamento de misturas para otimização da composição do filtro orgânico	60
4.6.2	Efeito da precipitação proteica na recuperação de TCAs	62
4.6.3	Planejamento Box-Behnken para otimização das condições de eletroextração.....	64
4.7	Validação do método.....	66
4.7.1	Seletividade.....	66
4.7.2	Efeito matriz	68
4.7.3	Linearidade	70
4.7.4	Limites de detecção e quantificação.....	70
4.7.5	Precisão intra e interdias	71
4.7.6	Recuperação.....	72
4.7.7	Eficiência de extração	72
4.7.8	Comparação entre amostras de saliva de diferentes voluntários.....	73
4.8	Utilização da técnica PS-MS como triagem para análise de TCAs em fluido oral.....	74
4.9	Perfil de corrente	77
5	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS.....	79
	APÊNDICE.....	88
A.	Otimização das condições de análise no espectrômetro de massas através do planejamento Doehlert.....	88
A1.	Planejamento Doehlert para os parâmetros voltagem do capilar e temperatura de dessorção.....	88
A2.	Planejamento Doehlert para os parâmetros energia de colisão e voltagem do cone	90
B.	Otimização da composição do filtro orgânico através do planejamento de misturas rede simplex.....	95
C.	Otimização dos fatores que afetam a eletroextração através do planejamento Box-Behnken.....	97

1 INTRODUÇÃO

A depressão é uma doença crônica e recorrente que acomete mais de 300 milhões de pessoas da população mundial e é a principal causa de incapacidade, segundo dados de 2018 da OMS (Organização Mundial da Saúde). Esses dados também mostram que as mulheres são mais afetadas que os homens. Tratamentos eficazes para a depressão são conhecidos, contudo, menos da metade das pessoas afetadas no mundo recebe tratamento adequado. Isso advém da falta de recursos, da falta de profissionais treinados, do estigma social associado aos transtornos mentais e também da avaliação imprecisa. Em todo o mundo, pessoas com depressão frequentemente não são diagnosticadas corretamente e outras que não têm a doença são muitas vezes tratadas com intervenções desnecessárias. O tratamento da depressão envolve terapias de diversos tipos e a administração de medicamentos antidepressivos¹ como os antidepressivos tricíclicos, os inibidores seletivos da recaptção de serotonina e os inibidores seletivos da recaptção de norepinefrina e serotonina, entre outros.

Os antidepressivos tricíclicos (TCAs) são conhecidos por sua eficácia no tratamento de depressões severas², mas também pela ampla gama de efeitos adversos resultantes de seu uso. Devido a isso e à janela estreita dos níveis terapêuticos dos TCAs, o monitoramento clínico é importante para um tratamento correto e eficaz do paciente.³ O sangue é uma matriz comumente usada nesse processo, contudo, o fluido oral é uma matriz promissora para esse fim já que permite, em muitos casos, uma relação entre os níveis de drogas no fluido oral e no sangue, além disso, apresenta facilidade de coleta, que não requer pessoal especializado e não é invasiva, também é de difícil adulteração já que é facilmente realizada na presença de outrem. Por essas características o fluido oral tem ganhado destaque em análises toxicológicas e de interesse forense frente às matrizes convencionais como sangue e urina.⁴

A complexidade das matrizes biológicas requer a utilização de técnicas de preparo de amostra com alto poder de pré-concentração e *clean-up*, associadas a análises de sensibilidade e seletividade adequadas que podem ser encontradas nas técnicas de separação acopladas à espectrometria de massas. Na literatura há muitos trabalhos de determinação de antidepressivos tricíclicos em amostras biológicas usando as técnicas de separação.^{5,6} Nos últimos cinco anos há um destaque maior para a cromatografia líquida, associada principalmente à extração líquido-líquido e suas modificações⁷⁻¹¹ e à extração em fase sólida e suas modificações.^{9,10,12-21}

Uma técnica de preparo de amostra que tem sido muito explorada nos últimos anos, sobretudo para matrizes biológicas, é a eletroextração em membrana, onde os analitos ionizados migram de forma eletrocinética atravessando duas interfaces ao saírem de uma amostra aquosa passando por uma camada de solvente orgânico imiscível em água e chegando a uma outra solução aquosa.²² Trabalhos de eletroextração em membrana contendo antidepressivos tricíclicos já foram relatados, nos quais os TCAs foram usados como analitos modelo²³⁻²⁶ e também sendo determinados em plasma e urina humanos²⁷ e em matrizes aquosas²⁸. Com base nesse sistema e na eletroextração sem o uso de membrana proposto por Raterink *et al.* (2013)²⁹, Orlando *et al.* (2017, 2019)^{30,31} desenvolveram um dispositivo multipoços que permite o preparo simultâneo de 66 amostras, em um sistema de eletroextração constituído de quatro fases: a amostra (fase doadora), o solvente orgânico imiscível em água (filtro orgânico), o suporte sólido e o eletrólito no qual é embebido (fase aceptora). Nesse trabalho, o suporte sólido constituiu-se de um cone odontológico composto de celulose.

A fim de simplificar a dessorção dos analitos do suporte sólido e permitir o uso direto desse suporte na espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS), no presente trabalho o cone odontológico foi substituído por papel cromatográfico. Sendo assim, a eletroextração multifases foi utilizada para a extração de antidepressivos tricíclicos presentes em amostras de fluido oral, determinados por cromatografia de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS), além de uma avaliação inicial do emprego da espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS).

1.1 Objetivo geral

Desenvolver um método analítico para a determinação dos antidepressivos tricíclicos: doxepina, imipramina, amitriptilina, nortriptilina e clomipramina em amostras de fluido oral usando a eletroextração como preparo de amostra e validar um método empregando a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial. Além de testes iniciais da espectrometria de massas com ionização por *paper spray* como técnica analítica alternativa.

1.2 Objetivos específicos

Adaptar o sistema de eletroextração para utilizar o papel cromatográfico como fase aceptora.

Otimizar os parâmetros que afetam a eletroextração avaliando: tempo de extração, potencial aplicado, tipo e percentual de solvente orgânico na fase doadora, tipos de eletrólito e sorvente usados na fase aceptora, influência de carreador no filtro orgânico e tipos de solvente usados como filtro orgânico.

Validar o método de preparo de amostra por eletroextração e análise por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial.

Avaliar a performance do método frente a amostras de fluido oral de diferentes voluntários.

Testar uma nova configuração da eletroextração com a fase aceptora suportada, visando um fácil acoplamento com a técnica de análise por espectrometria de massas com ionização por *paper spray*.

2 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Antidepressivos tricíclicos

Antidepressivos tricíclicos (TCAs) são substâncias usadas para tratamento de distúrbios de ansiedade e depressão³² e, em doses menores, como analgésico para o tratamento de dores neuropáticas.³³ São utilizados também em casos de transtorno obsessivo compulsivo e enurese noturna em crianças.³⁴ Os TCAs constituem a primeira geração de antidepressivos, juntamente com os inibidores da monoamina oxidase (MAOIs), e o seu surgimento se deu na década de 1950, com o desenvolvimento da imipramina. Anos seguintes os demais TCAs foram sintetizados a partir da modificação da estrutura da imipramina.^{35,36} A origem do nome dessa classe de antidepressivos está atrelada a sua estrutura química básica que consiste em três anéis condensados.³⁷ A **Figura 1** representa as estruturas de cinco desses fármacos, os quais foram abordados nesse trabalho.

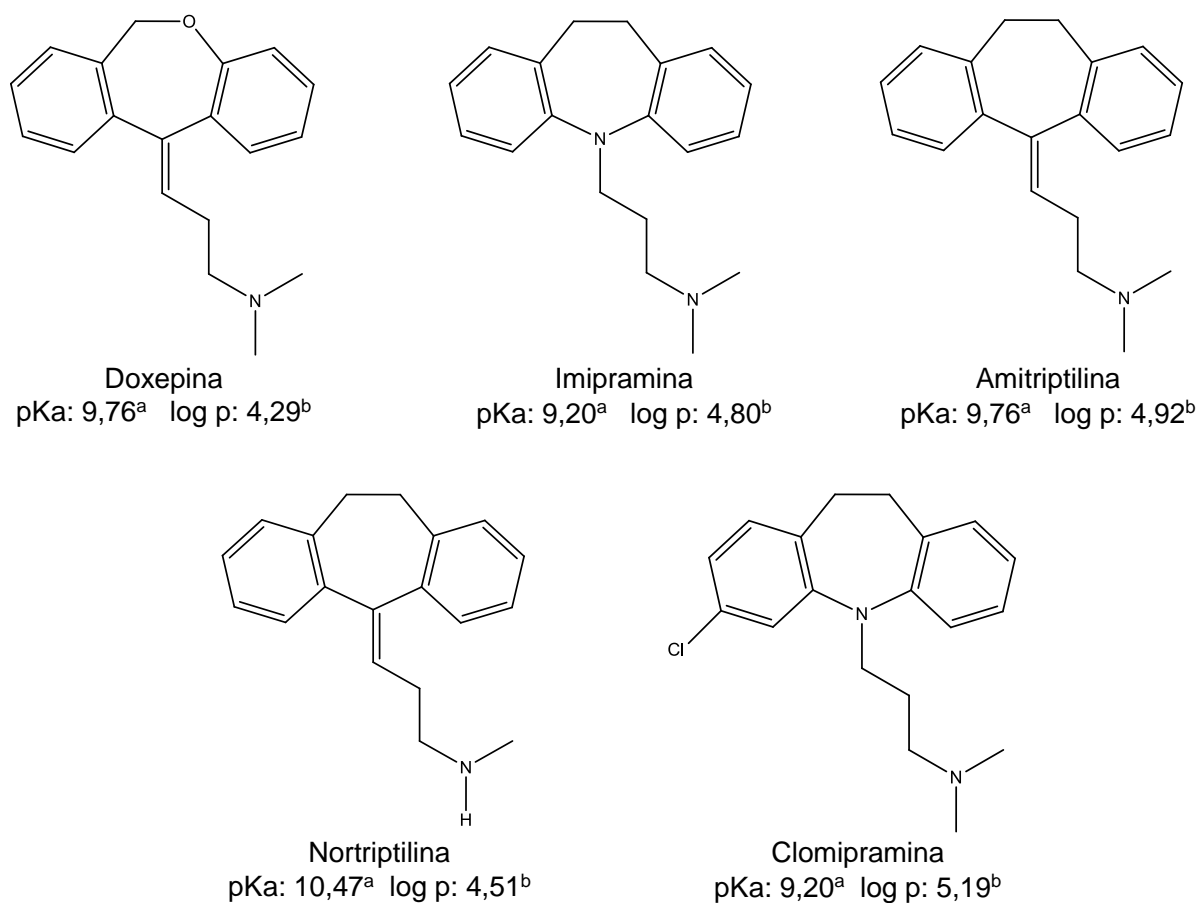


Figura 1. Estrutura molecular, ^a $-\log$ da constante de acidez³⁸ e ^b coeficiente de partição octanol/ água³⁹ dos TCAs: doxepina, imipramina, amitriptilina, nortriptilina e clomipramina.

Dentre esses cinco, a amitriptilina, nortriptilina e clomipramina estão entre os antidepressivos presentes no documento de 2020 do RENAME (Relação Nacional de Medicamentos Essenciais)⁴⁰ que dispõem dos medicamentos que devem estar gratuitamente disponíveis à população nos postos de saúde em âmbito nacional. E em Belo Horizonte, além desses três TCAs, a imipramina está presente no documento de 2018 do REMUNE (Relação Municipal de Medicamentos Essenciais)⁴¹. A nível mundial, a amitriptilina e a clomipramina estão na lista dos medicamentos essenciais publicada em 2019 pela Organização Mundial da Saúde.⁴²

O mecanismo de ação dos antidepressivos tricíclicos se baseia na inibição ou retardo da recaptção de serotonina e de norepinefrina pela membrana sináptica, fazendo com que os níveis desses neurotransmissores aumentem no cérebro.⁴³ Porém, por apresentarem um perfil farmacológico diversificado, os TCAs causam também o bloqueio de receptores α_1 e α_2 adrenérgicos pós-sinápticos, de receptores muscarínicos pós-sinápticos; e de receptores H1 pós-sinápticos de histamina, ocasionando, com isso, diversos efeitos colaterais como ganho de peso, boca seca, constipação, tontura, comprometimento da memória e sonolência, entre outros. Esses três últimos estão diretamente relacionados respectivamente aos três bloqueios supracitados³⁶. Efeitos colaterais cardiotoxicos também são induzidos devido a sua ação nos canais cardíacos dos íons sódio e cálcio. Mesmo com esses inconvenientes os antidepressivos tricíclicos são por vezes preferidos pelos psiquiatras em detrimento dos inibidores seletivos da recaptção de serotonina (SSRI), uma vez que a ação desses últimos pode não ser suficiente para determinado paciente.⁴³

Embora se considere que a eficácia dessas duas gerações de antidepressivos sejam equivalentes, como visto em um estudo de 2000,⁴⁴ uma pesquisa comparativa sobre a eficácia e aceitabilidade de antidepressivos publicada em 2018, traz a amitriptilina, um TCA, como um dos antidepressivos mais eficazes no tratamento da depressão em adultos e a fluoxetina, um SSRI, como um dos menos potentes, embora em termos de aceitabilidade esses resultados se invertam.⁴⁵ No Brasil, os antidepressivos fluoxetina, sertralina e amitriptilina estão entre os cinco princípios ativos de controle especial (portaria SVS/MS nº 344/1998) mais consumidos no ano de 2011, segundo dados do Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados (SNGPC).⁴⁶

O fato é que mesmo que os antidepressivos tricíclicos não sejam a primeira escolha no tratamento da depressão, eles ainda são usados, principalmente em casos onde a doença é mais severa, e auxilia também nos tratamentos de outros tipos de doença. Sendo assim a determinação dessas drogas em matrizes biológicas é de grande valia seja para a realização de monitoramentos terapêuticos visando um tratamento mais assertivo para os

pacientes ou em análises de interesse forense, como por exemplo, em casos de overdose, dentre outros casos.

2.2 A saliva como matriz em bioanálises

A urina e o sangue, mais especificamente o plasma, são as matrizes mais usadas para determinações de drogas em amostras biológicas. E isso também inclui os TCAs. A saliva apesar de não ser uma matriz convencional, é muitas vezes citada como uma ótima alternativa frente a essas matrizes já consagradas, devido, dentre outras vantagens, a sua facilidade na coleta que é realizada de forma não invasiva e não requer especialização de quem a recolhe.

A saliva, ou mais apropriadamente, o fluido oral é constituído de 98% de água, 0,7% de proteínas, principalmente amilases, 0,26% de glicoproteínas (mucinas) e eletrólitos como sódio, potássio, cloreto e bicarbonato. Possui pH na faixa de 5,5 a 7,9.⁴ O termo fluido oral é preferido, uma vez que a saliva é composta especificamente pela secreção das glândulas salivares (parótida, submaxilar e sublinguais), enquanto que o fluido oral abrange também o transudato da mucosa e o fluido crevicular. Os fluidos secretados pelas glândulas salivares diferem significativamente entre si sendo afetados pelo tipo, intensidade e duração da estimulação, pela hora do dia, pela dieta, pela idade e sexo dos indivíduos e por uma variedade de doenças e agentes farmacológicos.^{47,48} A partir daqui os termos saliva e fluido oral serão usados de forma indiscriminada.

Como a saliva é efetivamente um fluido ultrafiltrado do sangue os compostos orgânicos presentes no plasma sanguíneo podem ser detectados nela, mas em quantidades muito baixas dependendo do analito. A transferência desses compostos para a saliva se dá principalmente por difusão passiva e ultrafiltração.⁴

No que diz respeito aos monitoramentos terapêuticos de drogas (TDM), o uso do plasma sanguíneo como matriz é a primeira escolha, pois nele são encontradas as concentrações responsáveis pela ação farmacológica, pelos efeitos colaterais e tóxicos de uma substância. Porém na literatura há muitos trabalhos explorando o uso da saliva em detrimento do sangue para esses processos de monitoramento, já que as quantidades de uma substância encontrada na saliva, correspondem aos níveis dessa droga livre no sangue. Mas ocorre que, para algumas substâncias, a relação entre suas concentrações no plasma e na saliva não é bem estabelecida, o que acaba por inibir a utilização de forma prática da saliva em TDM. Nesses casos, a saliva pode auxiliar no TDM, não extinguindo o uso do sangue,

mas fornecendo mais informação acerca das substâncias livres no plasma.⁴⁹ A saliva pode ser uma matriz importante também em análises de cunho forense.

Apesar do interesse crescente na utilização da saliva em bioanálises, os trabalhos de determinação de TCAs em saliva não são muitos, e nada foi encontrado nos últimos cinco anos, como se pode observar nos trabalhos resumidos na **Tabela 1**, onde o plasma e a urina são a maioria entre as matrizes.

2.3 Técnicas analíticas e de preparo de amostras para TCAs

Há uma ampla variedade de métodos publicados para a determinação de TCAs em amostras biológicas, sobretudo plasma e urina, como pode ser visto na **Tabela 1**. Nela encontram-se os métodos usados para a determinação de TCAs nos últimos cinco anos. E claramente as técnicas analíticas de separação são dominantes nesse tipo de análise. As variações recorrentes no ambiente analítico estão na busca por melhorias nos procedimentos de preparo de amostra, seja pela modificação daqueles já existentes; pela combinação entre eles ou ainda pela adição de algum elemento, como por exemplo a aplicação de campo elétrico. É válido ressaltar que nesse período de busca, nenhum desses procedimentos de preparo foi assistido por campo elétrico, apesar de esse ser um recurso com grande potencial para o aumento de seletividade e redução do tempo dos procedimentos de preparo de amostra. E que ganhou grande destaque a partir de 2006 com o surgimento da eletroextração utilizando membranas.⁵⁰

Tabela 1. Revisão dos métodos de determinação de antidepressivos tricíclicos em amostras biológicas nos últimos 5 anos baseados em técnicas analíticas de separação.

Técnica	Analito	Preparo de amostra	Faixa linear (ng mL ⁻¹)	LD (ng mL ⁻¹)	LQ (ng mL ⁻¹)	Amostra	Ref
CE-PDA	DOX, IMI	SPE	60 – 5000	20	NA	sangue	14
GC-FID	IMI	MSPE	5 – 5000	3	5	plasma	15
GC-FID	AMI, CLO, IMI, NOR	DSPE e	0,027 – 5000	0,008 – 0,015	0,027 – 0,049	plasma e urina	51
		AA-DES-LPME	0,108 – 5000	0,032 – 0,060	0,108 – 0,191		
GC-MS	NOR	HF-DDSME	500 – 5000	9 e 21	NA	urina e sangue	52
GC-FID	AMI, IMI	AALLME	15 – 2000	5 – 7	15 – 20	plasma	7
GC-MS	AMI, NOR	SPE	1 – 320	1 – 2,5	NA	urina e plasma	16
GC-FID	AMI, CLO, IMI	LLE e DLLME	0,003 – 1,5	1 – 3	3 – 10	plasma	8
GC-FID	CLO	MSPE e DLLME	10 – 3000	4	10	urina	9
GC-MS	AMI, DOX, IMI	SUPRAS-ME	0,01 – 100	0,003 – 0,02	NA	urina e plasma	53
LC-MS	AMI, CLO, IMI, NOR	PP	20 – 500	NA	20 – 40	sangue	54
LC-RRS	AMI, DOX, CLO, IMI	Precipitação	50 – 20000	0,42 – 21	NA	urina	55
LC-UV	AMI, DOX, NOR	D μ SPE-CAE	5 – 1000	0,51 – 1,4	1,7 – 4,8	plasma e urina	17
LC-UV	AMI, IMI	EC-SPME	80 – 1000	< 40	< 80	plasma	18
LC-UV	AMI, CLO	CLPME	1 – 800	0,35 – 0,7	NA	urina	56

Tabela 1. continuação

Técnica	Analito	Preparo de amostra	Faixa linear	LD	LQ	Amostra	Ref
LC-MS	IMI	SPE	1 – 50	0,3	1	plasma	19
LC-UV	AMI	μSPE	14 - 1000	15	30	urina	20
LC-MS	DOX	LLE	0,015 – 3,9	NA	0,015	plasma	11
LC-UV	AMI, IMI	MSPE	8 – 800	4	8	urina e plasma	21
LC-UV	AMI, CLO, IMI, NOR	SI-HLLE, DSPE e DLLME-SFO	0,71 – 1000	0,22 – 0,31	0,35 – 0,45	urina	12
LC-DAD	AMI, CLO	FPSE	500 – 15000	150	500	serum	57
LC-UV	AMI, NOR	EA-DM-μSPE	0,07 – 2000	0,03 – 0,05	0,07 – 0,1	urina	13
LC-UV	AMI, IMI, NOR	FDE e LPME	5 – 2000	1,5 – 3	5 – 10	urina	58
LC-DAD	AMI, CLO	FPSE	500 – 20000	150	500	urina	59
LC-MS	AMI, NOR	PP	0,5 – 400	0,020	0,5	serum	60

CE-PDA: eletroforese capilar com detector de arranjo de fotodiodos; GC-FID: cromatografia gasosa com ionização por chama; GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; LC-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; LC-RRS: cromatografia líquida com espalhamento Rayleigh ressonante; LC-UV: cromatografia líquida com detecção por ultravioleta-visível; LC-DAD: cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos; SPE: extração em fase sólida; MSPE: extração em fase sólida magnética; DSPE: extração em fase sólida dispersiva; AA-DES-LPME: *air assisted liquid phase microextraction deep eutectic solvent*; HF-DDSME: *hollow fiber drop-to-drop solvente microextraction*; AALLME: microextração líquido-líquido assistida por ar; LLE: extração líquido-líquido; LLME: microextração líquido-líquido; SUPRAS-ME: microextração baseada em solventes supramoleculares; DμSPE-CAE: *dispersive micro solid phase extraction combined with coacervative extraction*; EC-SPME: microextração em fase sólida eletroquimicamente controlada; CLPME: microextração em fase líquida contínua; μSPE: micro extração em fase sólida; SI-HLLE: extração líquido-líquido homogênea por *salting out*; DLLME-SFO: microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante; FPSE: *fabric phase sorptive extraction*; EA-DM-μSPE: *effervescent salt-assisted dispersive magnetic micro solid-phase extraction*; FDE: *filter based dual emulsification*; PP: precipitação proteica; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; NA: não apresentado; Ref: referências.

2.3.1 Eletroextração

A eletroextração foi apresentada em 1987 como uma técnica de separação assistida por campo elétrico na qual analitos ionizados migram de uma fase líquida para outra.⁶¹ Dentre as suas várias modalidades destaca-se a eletroextração em membrana, apresentada em 2006 por Pedersen-Bjergaard e Rasmussen²² e intitulada primeiramente de *electromembrane isolation* (EMI). A EME é baseada na HF-LPME (microextração em fase líquida com fibra oca) onde os analitos são extraídos por difusão passiva, de modo que as duas técnicas possuem o mesmo arranjo, diferindo apenas pela aplicação do campo elétrico. Na EME (**Figura 2a**) o processo de extração se dá majoritariamente pela migração electrocinética dos analitos que estão presentes na amostra aquosa (fase doadora). Ao saírem da amostra, os analitos passam por uma fibra oca porosa (HF) impregnada com um solvente orgânico imiscível em água que funciona como um filtro para interferentes. Essa camada de líquido é chamada de SLM (membrana líquida suportada). Após atravessar a membrana os analitos chegam à fase acceptora (eletrólito) presente no interior (lúmen) da fibra. Para melhor convecção dos analitos na fase doadora, a extração geralmente ocorre sob agitação.

Baseado nesse mesmo princípio de extração assistida por campo elétrico, Raterink *et al.*²⁹ apresentaram em 2013 o que se denominou como eletroextração trifásica (**Figura 2b**), na qual o uso da HF foi dispensada, deixando a fase orgânica livre, chamada de membrana líquida livre (FLM). A fase acceptora passou a ser constituída de uma gota pendente em uma ponteira condutora, com o sistema funcionando na ausência de agitação.

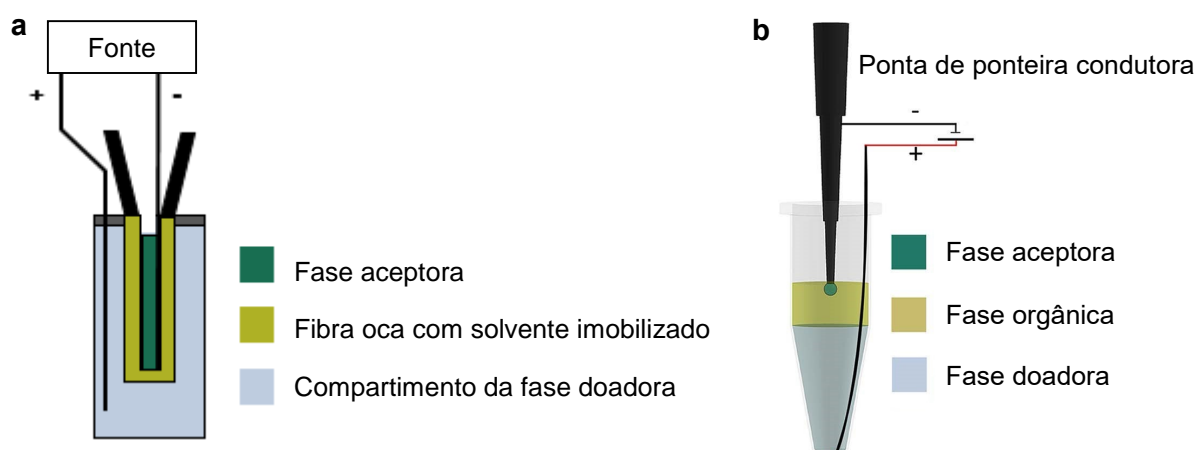


Figura 2. Representações do sistema de (a) eletroextração em membrana e de (b) eletroextração trifásica. Adaptadas de Pedersen-Bjergaard e Rasmussen²² e Raterink *et al.*²⁹ respectivamente. Polos elétricos representados para extração de analitos catiônicos.

A fim de tornar a fase aceptora mais estável, baseado no sistema proposto por Raterink *et al.* (2013)²⁹, Orlando *et al.* (2017, 2019)^{30,31} desenvolveram um sistema multifases (líquido-líquido-líquido suportado em sólido) passível de realizar extrações simultâneas de 66 amostras. Nesse sistema a fase orgânica é livre, denominada filtro orgânico (FO) e a fase aceptora consiste de um eletrólito suportado em um cone odontológico (**Figura 3**). Dessa forma, etapas de dessorção dos analitos do cone de papel são necessárias para a realização posterior da análise.

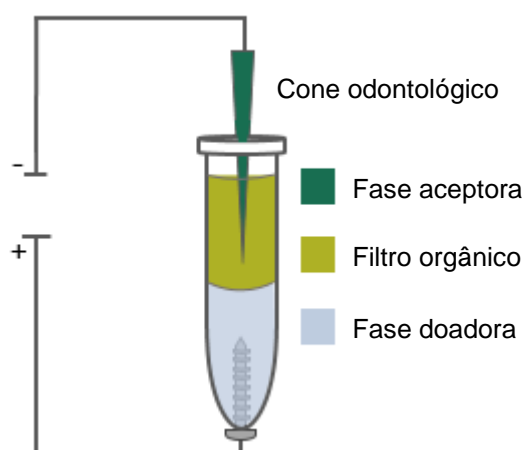


Figura 3. Representação do sistema de eletroextração multifases com a fase aceptora constituída de eletrólito suportado em cone odontológico. Adaptado de Orlando *et al.*³¹ Polos elétricos representados para extração de analitos catiônicos.

Para facilitar a dessorção dos analitos do material sorvente e possibilitar a aplicação direta da eletroextração à espectrometria de massas com ionização por *paper spray*, o cone odontológico foi substituído, no presente trabalho, por papel cromatográfico no formato triangular com um corpo alongado.

2.3.1.1 Fatores que afetam a eletroextração

Na EME a extração dos analitos ocorre numa combinação da eletroforese e da distribuição (difusão e partição), sendo essa última de contribuição pequena. A teoria de transferência de massa dos analitos apresenta duas abordagens, uma num estado estático e outra dependente do tempo.^{62,63} A extração dependente do tempo, a qual será abordada aqui, pode ser expressa pela Equação 1 e Equação 2. Nessas equações o termo $C_{A_i}(t)$ é a concentração do analito i , em função do tempo, na fase aceptora. No momento que a eletroextração começa até um tempo determinado de residência do analito na SLM (t_{lag}), a concentração do analito na fase aceptora é nula, já que suas moléculas ainda não chegaram

a essa fase. Após o t_{lag} , moléculas do analito podem ser encontradas na fase aceptora e então a concentração do analito é calculada pela diferença entre a quantidade de analito inicial na amostra (fase doadora) e a quantidade de analito em função do tempo remanescente na amostra e no filtro orgânico, através da Equação 2. Nela V_D é o volume de amostra; $C_{D_i}^0$ é a concentração original do analito na amostra; $C_{D_i}(t)$ é a concentração do analito na amostra em função do tempo; k_d^* é o coeficiente de distribuição do analito dependente da voltagem; V_m é o volume da SLM e V_A é o volume da fase aceptora. A concentração do analito na fase doadora ao longo do tempo $C_{D_i}(t)$ é expressa pela Equação 3 onde A_f é a área superficial ativa da SLM e $P_i^{D \rightarrow A}$ é a constante de permeabilidade do analito na SLM. O coeficiente de distribuição k_d^* é diretamente relacionado com a diferença de potencial elétrico entre a fase doadora e a SLM e é determinado pela Equação 4, onde Z_i é a carga do analito i ; F é a constante de Faraday; R é a constante dos gases ideais; T é a temperatura absoluta; $\Delta_0^w \varphi$ é a diferença de potencial galvânico entre a fase doadora e a SLM e, por fim, $\Delta_0^w \varphi_i^0$ é uma propriedade relacionada à hidrofobicidade do analito i .

$$C_{A_i}(t) = 0 \quad \text{para } t < t_{lag} \quad \text{Equação 1}$$

$$C_{A_i}(t) = \frac{V_D C_{D_i}^0 - C_{D_i}(t) (V_D + k_d^* V_m)}{V_A} \quad \text{para } t \geq t_{lag} \quad \text{Equação 2}$$

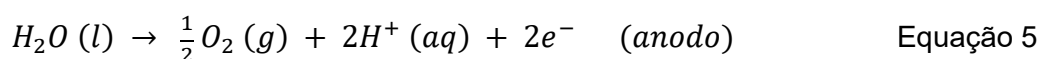
$$C_{D_i}(t) = C_{D_i}^0 \exp\left(\frac{-A_f P_i^{D \rightarrow A}}{V_D} t\right) \quad \text{Equação 3}$$

$$k_d^* = \exp\left(\frac{Z_i F}{RT} (\Delta_0^w \varphi - \Delta_0^w \varphi_i^0)\right) \quad \text{Equação 4}$$

Através de uma simples inspeção das equações acima algumas informações acerca da extração dos analitos podem ser observadas: a extração tende a aumentar com o aumento do tempo e do potencial aplicado, contudo isso ocorre até um certo nível,⁶⁴ e já foi visto que o valor do tempo limita o valor do potencial e vice-versa.⁶⁵⁻⁶⁷ Diminuindo o volume da fase doadora e aumentando a área superficial da SLM a extração também aumenta. Outro fator muito importante é a escolha do solvente que compõe a SLM. Isso porque sua

capacidade de solvatação dos analitos e sua viscosidade influenciam respectivamente os parâmetros k_d^* e $P_i^{D \rightarrow A}$, de modo que é importante que os analitos tenham certa afinidade pelo solvente usado como SLM e que esse último tenha baixa viscosidade. Outras características da SLM necessárias para o bom funcionamento do sistema são: pouca solubilidade em água (solubilidade menor que 1 g/L); baixa pressão de vapor e baixa condutividade.⁶⁴ Ainda com relação à afinidade do analito pelo solvente da SLM, na literatura há um consenso de que analitos básicos são melhor extraídos quando são usados solventes formadores do filtro orgânico com grupos aceptores de próton capazes de solvatá-los por meio de ligações de hidrogênio, característica encontrada, por exemplo, no NPOE (2-nitrofenil octil éter), um solvente muito usado por sua alta performance na extração de analitos básicos não polares ($\log p > 2$).^{63,64,68,69} Porém, quando os analitos são mais polares ($\log p < 2$), moléculas chamadas carreadoras como o DEPH (di (2-etilhexil-fosfato)) e o TEHP (tris (2etilhexil-fosfato)) têm sido adicionadas, principalmente, ao NPOE, para auxiliar a passagem desses analitos pela SLM através da formação de pares iônicos⁷⁰⁻⁷² que possuem maior afinidade pelo solvente da SLM que os analitos ionizados livres. Para a extração de analitos ácidos, solventes com grupos doadores de próton capazes de realizar ligações de hidrogênio, como os álcoois, são mais eficientes, como é o caso do 1-octanol.^{63,64}

Na prática, além desses fatores abordados, o pH das fases doadora e aceptora podem influenciar na extração dos analitos. Isso porque além de ser necessário que os analitos estejam ionizados para serem extraídos, as reações de eletrólise (Equação 5 e Equação 6) que ocorrem devido à passagem de corrente no sistema, podem levar a mudanças nos valores de pH de ambas as fases.²²



No caso de extrações de analitos básicos, o processo de eletrólise causa uma diminuição no pH da fase doadora e um aumento no pH da fase aceptora, esse último, se muito pronunciado pode caracterizar um problema visto que se os analitos não permanecerem ionizados nessa fase eles retornam ao filtro, por difusão, diminuindo a sua extração.²²

Nos procedimentos de EME é relatado a importância de se ter um gradiente de pH entre as fases doadora e aceptora para se obter valores adequados de recuperação dos analitos. Isso porque a extração dos analitos catiônicos aumenta quando o número de íons hidrônio na fase aceptora é maior que na fase doadora.^{69,73} No entanto, essa condição não é

um fator limitante, pois muitos são os trabalhos com percentuais elevados de extração usando o mesmo pH em ambas as fases. E de um modo geral o pH da fase doadora não influencia tanto quanto o pH da fase aceptora.²² Essa última solução deve ser necessariamente ácida para extrações de analitos catiônicos e, segundo Restan *et al.* (2017),⁷⁴ com pH pelo menos três unidades abaixo do pK_a do analito.

2.3.1.2 Extração de TCAs por eletroextração em membrana

Uma quantidade considerável de trabalhos na literatura trata da eletroextração de TCAs como analitos modelo e outros poucos voltados para a sua determinação de fato. Nesses trabalhos além da EME convencional, variações também foram apresentadas como a microextração em membrana de múltiplas fases com a membrana líquida livre⁷⁵ e a eletroextração em membrana de duas fases.^{24,28} Na **Tabela 2** estão resumidas algumas condições usadas nos procedimentos de eletroextração em membrana envolvendo TCAs. Majoritariamente o NPOE é empregado como SLM (filtro orgânico) e soluções de HCl são usadas como fase aceptora. Na grande maioria dos trabalhos a EME está associada às técnicas de separação cromatográficas e eletroforética com detectores diversos.

Tabela 2. Trabalhos publicados a respeito da eletroextração em membrana contemplando antidepressivos tricíclicos.

Analito/ matriz	Fase doadora	Filtro orgânico	Fase aceptora	Potencial e tempo	Técnica de análise	Ref
Nortriptilina/ plasma	10 mmol L ⁻¹ HCl	ENB	1. 10 mM HCl 2. 5 mM tampão acetato (pH 4,7)	300 V 5 min	HPLC-MS/MS	75
Amitriptilina/ plasma	10 mmol L ⁻¹ HCl	NPOE	20 mM HCOOH	250 V 15 min	HPLC-MS/MS	25
Imipramina e amitriptilina/ água e urina	pH 6 (HCl)	NPOE	NPOE	10 V 10 min	HPLC-UV	28
Clomipramina e imipramina/ plasma e urina	pH 4 (HCl)	NPOE	pH 2 (HCl)	200 V 20 min	GC-FID	71
Imipramina/ urina	pH neutro (sem ajuste)	1-heptanol	1-heptanol	60 V 15 min	GC-MS	24
Nortriptilina e clomipramina/ solvente	10 mmol L ⁻¹ HCl	NPOE	10 mM HCl	300 V 5 min	CE-UV	70
Nortriptilina/ plasma e urina	10 mmol L ⁻¹ HCl	NPOE	10 mM HCl (pH 2)	300 V 5 min	CE-UV	22
Amitriptilina e doxepina/ plasma e urina	pH neutro	NPOE	H ₂ O pH neutro	120 V 20 min	GC-FID	76

ENB: 1-etil-2-nitrobenzeno; NPOE: 2-nitrofenil octiléter; HPLC-MS/MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial; HPLC-UV: cromatografia líquida de alta performance com detecção por ultravioleta-visível; GC-FID: cromatografia gasosa com ionização por chama; GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; CE-UV: eletroforese capilar com detecção por ultravioleta-visível; Ref: referências.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e Reagentes

A água deionizada (18,2 MΩ cm) foi obtida do sistema Milli-Q water purification (Millipore, Bedford, MA, EUA). Os sais de cloridrato de clomipramina, doxepina, imipramina, amitriptilina e nortriptilina foram obtidos da Gemini (São Bernardo do Campo, SP, Brasil). O sal cloridrato de ciclobenzaprina foi obtida de manipulação fornecida pela Drogaria Araújo (Belo Horizonte, MG, Brasil). Os solventes metanol (MeOH) e isopropanol foram obtidos da J T Baker (Center Valley, PA, EUA), a acetonitrila (ACN) da Merck (Darmstadt, HE, Alemanha) e o 1-octanol da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos), todos com grau HPLC. Os reagentes P.A. ácido fórmico, ácido clorídrico, tetrahidrofurano (THF), acetato de sódio (NaAc) e acetato de amônio (NH₄Ac) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, HE, Alemanha), o ácido acético (HAc) da F. maia (Belo Horizonte, MG, Brasil), etanol, cloreto de cálcio diidratado, ácido cítrico, fosfato de sódio bibásico, violeta genciana e sal dissódico de carboximetilcelulose da Synth (Diadema, SP, Brasil), cloreto de sódio da Sigma Aldrich (St Louis, MO, EUA), fosfato de potássio dibásico da Neon (São Paulo, SP, Brasil) e fosfato de potássio monobásico da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil). A α-amilase (*aspergillus oryzae*) 36 U/ mg foi obtida da Sigma Aldrich e a curcumina foi obtida de manipulação fornecida pela Drogaria Araújo (Belo Horizonte, MG, Brasil). Foram utilizados papéis cromatográficos dos tipos Whatman 1 Chr e 3MM Chr (Little Chalfont, Bucks, Inglaterra) cortados em formato retangular com uma das extremidades na forma de um triângulo isósceles com ângulo central de 50°. As dimensões aproximadas foram de 3,5 cm de comprimento por 0,8 cm de largura.

3.2 Equipamentos

Os reagentes sólidos foram pesados em balança analítica Shimadzu ATX 224, a aplicação de potencial ao sistema de eletroextração foi realizada através de uma fonte de eletroforese KASVI K33-300V ou Fisher Scientific FB300. Para o registro da corrente elétrica utilizou-se o multímetro Tekpower TP4000ZC com um comunicador RS-232 conectado ao microcomputador Intel Pentium com o sistema operacional Microsoft Windows XP contendo o *software* Multi Meter Interface, através do qual foi realizada a aquisição de dados. Para a dessorção dos analitos utilizou-se vortex Velp Scientifica ZX Class e ultrassom Ultrasonic Ney 28B. Os valores de pH foram medidos no pHmetro JKI JK-PHM-005. As análises foram realizadas no sistema UPLC® Acquity H Class (Waters) acoplado ao espectrômetro de massas

Xevo TQD (Waters) com fonte de ionização por eletrospray (*electrospray*) e analisador do tipo triplo quadrupolo. E para as análises por *paper spray* utilizou-se o espectrômetro de massas LCQ Fleet (Thermo) com ionização por eletrospray (*electrospray*) e analisador do tipo armadilha de íons (*ion trap*).

3.3 Preparo das soluções utilizadas

3.3.1 Soluções estoque e trabalho dos analitos

As soluções estoque dos analitos doxepina (DOX), imipramina (IMI), amitriptilina (AMI), nortriptilina (NOR) e clomipramina (CLO) a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ e do padrão interno ciclobenzaprina (CBZ) a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram preparadas pesando quantidades apropriadas de cada sal na forma de cloridrato e solubilizando-os individualmente em metanol. As soluções estoque foram mantidas a 4°C . A partir delas foi preparada a cada experimento uma solução (amostra) contendo os cinco analitos a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, cada um.

3.3.2 Saliva artificial

A saliva artificial foi preparada conforme a composição descrita por Arain *et al.* (2014)⁷⁷ com algumas adaptações: o metilparabeno não foi adicionado e a concentração de carboximetilcelulose foi reduzida pela metade. A saliva foi constituída de 2,5 unidades mL^{-1} de α -amilase, KCl $0,625 \text{ g L}^{-1}$; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0,166 \text{ g L}^{-1}$; K_2HPO_4 $0,804 \text{ g L}^{-1}$, KH_2PO_4 $0,326 \text{ g L}^{-1}$ e de carboximetilcelulose sal dissódico 5 g L^{-1} solubilizados em água deionizada.

A fortificação da saliva artificial foi realizada a cada experimento adicionando quantidades adequadas das soluções estoque dos analitos resultando na concentração final de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada um deles. A saliva fortificada foi agitada no vortex a 2000 rpm por 15 segundos para melhor homogeneização.

3.3.3 Saliva real

Foram utilizadas amostras de saliva de voluntários sadios com idades entre 21 e 30 anos (cinco mulheres e cinco homens) recolhidas com pelo menos meia hora após alimentar-se e/ou escovar os dentes. As amostras foram recolhidas, sem estimulação, diretamente em recipientes que foram mantidos a 4°C até a realização do experimento. (Protocolo do comitê de ética em pesquisa: CAAE 32011214600005149)

3.3.4 Demais soluções

As soluções de ácido acético (400 mmol L^{-1}), ácido clorídrico (10 mmol L^{-1}), ácido fórmico (400 mmol L^{-1}), acetato de sódio (100 mmol L^{-1}), e de acetato de amônio (50 e 100 mmol L^{-1}) foram preparadas em água deionizada.

3.4 Condições cromatográficas e espectrométricas

A separação cromatográfica foi obtida usando uma coluna Acquity UPLC[®] HSS de sílica modificada com grupos C18 de 50 mm de comprimento, $1,8 \mu\text{m}$ de tamanho de partícula e 2,1 mm de diâmetro interno. A coluna e o amostrador foram mantidos às temperaturas de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ e $25 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. A fase móvel constituiu-se de água deionizada com ácido fórmico a 0,1% (v/v) (fase A) e metanol com ácido fórmico a 0,1% (v/v) (fase B), com eluição em modo gradiente (**Figura 4**) e vazão de $400 \mu\text{L min}^{-1}$. A composição da fase móvel iniciou-se com 55% de B, alcançando 95% em 0,7 min. Permaneceu-se nessa proporção por 1 minuto, depois retornou-se imediatamente (após 0,01 min) à condição inicial que foi mantida até 2 minutos, tempo total da análise. Um volume de $1 \mu\text{L}$ de amostra foi injetado.

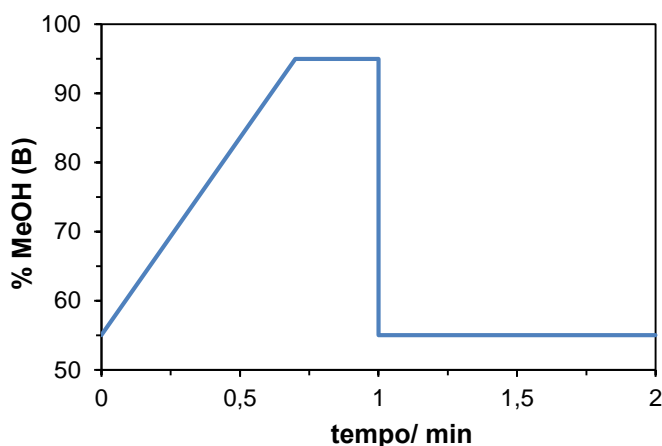


Figura 4. Gradiente de injeção usado na análise de TCAs por UHPLC-MS/MS.

As análises no espectrômetro de massas foram realizadas com sistema de ionização por eletrospray (*electrospray*) no modo positivo (+), utilizando as seguintes condições iniciais: temperatura da fonte de $150 \text{ }^\circ\text{C}$, temperatura de dessolvatação de $350 \text{ }^\circ\text{C}$, vazão dos gases de dessolvatação (N_2) de 900 L h^{-1} e do contra fluxo do cone (N_2) de 25 L h^{-1} e voltagem do capilar de $3,3 \text{ kV}$. O modo de aquisição de íons foi o MRM (monitoramento de reações múltiplas). As transições e os valores de energia de colisão e

voltagem do cone utilizados para cada um dos analitos protonados estão dispostas na **Tabela 3**. Os dados obtidos com as análises das amostras foram tratados no *software* MassLynx 4.1.

Tabela 3. Transições, energias de colisão e voltagens do cone para os analitos.

Analito	Transições (<i>m/z</i>)*	Energia de colisão (V)	Voltagem do cone (V)
DOX	280 > 107	25	30
	280 > 233	15	30
IMI	281 > 86	15	30
	281 > 58	30	30
AMI	278 > 91	25	35
	278 > 105	25	35
NOR	264 > 91	20	30
	264 > 105	20	30
CLO	315 > 86	20	30
	315 > 58	30	30

* As primeiras transições de cada analito foram usadas para quantificação e as segundas para confirmação.

3.5 Triagem das condições de análise no espectrômetro de massas através do planejamento fatorial fracionário 2_{III}^{13-9}

O planejamento fatorial fracionário tem a fórmula geral 2^{k-b} , sendo $b > 0$ e inteiro, onde k é o número de variáveis a serem estudadas e b é o tamanho da fração⁷⁸. O planejamento 2^{13-9} (resolução III) é um tipo de fatorial fracionário saturado, devido ao número elevado de variáveis a serem estudadas e um número reduzido de experimentos. Por esse fato, o planejamento não leva em consideração os efeitos das interações entre as variáveis e só fornece informações dos efeitos principais.

Nesse planejamento 13 variáveis foram testadas em dois níveis e para cada experimento uma solução de TCAs $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ em MeOH: ACN: HAc (47,5: 47,5: 5 v/ v/ v) foi injetada no UPLC-MS/MS, em triplicata. Os parâmetros avaliados estão dispostos na **Tabela 4**, assim como os níveis estudados no planejamento. Tais níveis foram escolhidos

com base no método de análise levantado da literatura, para o mesmo tipo de fonte de ionização e analisador de massas, e alterando esses valores para menos caso ele estive próximo do máximo permitido pelo equipamento ou para mais e para menos caso fosse possível. Os dados obtidos com esse planejamento foram tratados no *software* Statistica 10.

Tabela 4. Níveis inferior e superior das 13 variáveis estudadas no planejamento fatorial fracionário 2_{III}^{13-9} para os cinco analitos.

Variáveis	Níveis	
	(-)	(+)
1 Energia de colisão (V)	15	30
2 Voltagem do cone (V)	20	40
3 Voltagem capilar (kV)	2,5	4
4 Temperatura da fonte (°C)	120	150
5 Temperatura de dessolvatação (°C)	300	450
6 Vazão do gás de dessolvatação (L h ⁻¹)	700	900
7 Vazão do gás do cone (L h ⁻¹)	20	50
8 <i>High mass resolution 1</i>	4	7
9 <i>Low mass resolution 1</i>	4	7
10 <i>Ion energy 1</i>	0,1	0,6
11 <i>High mass resolution 2</i>	4	7
12 <i>Low mass 2 resolution 2</i>	4	7
13 <i>Ion energy 2</i>	0,1	0,6

3.6 Otimização das condições de análise no espectrômetro de massas através do planejamento Doehlert

Após a triagem das variáveis relacionadas à análise no espectrômetro de massas, fez-se um planejamento de otimização dos parâmetros mais significativos para os cinco analitos, sendo eles a energia de colisão, a voltagem do cone, a voltagem do capilar e a temperatura de dessolvatação. O planejamento utilizado foi a matriz Doehlert, um planejamento quadrático de fórmula geral $N = k^2 + k + PC$, onde N é o número de experimentos, k é o número de variáveis e PC é o ponto central. Esse planejamento permite o estudo das variáveis em níveis diferentes para cada uma delas (3 e 5 no caso de duas variáveis), permitindo o estudo mais aprofundado das variáveis mais significativas.⁷⁹

Dois planejamentos foram realizados para otimizar as quatro variáveis, um para os parâmetros temperatura de dessolvatação e voltagem do capilar, que são comuns a todos os analitos e outro planejamento para os parâmetros energia de colisão e voltagem do cone, que assumem valores individuais para cada analito. Para as variáveis cujos os efeitos foram mais significativos, usou-se 5 níveis. Para a realização da otimização os parâmetros pouco ou não significativos, dependendo do analito, do planejamento 2_{III}^{13-9} tiveram seus valores fixados nos níveis que geraram maior resposta, com exceção da vazão do gás de dessolvatação dada uma limitação operacional momentânea do nosso equipamento. Uma injeção teste foi realizada confirmando o aumento da resposta dos analitos com a modificação desses parâmetros. Tanto para esse teste como para a otimização continuou-se a usar uma solução de TCAs $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ em MeOH: ACN: HAc (47,5: 47,5: 5 v/ v/ v) que foi injetada em triplicata para cada experimento. Depois disso, a otimização dos parâmetros temperatura de dessolvatação e voltagem do capilar foi realizada e com as melhores condições encontradas foi feita a otimização dos parâmetros energia de colisão e voltagem do cone. A **Tabela 5** e a **Tabela 6** mostram os níveis estudados para cada uma das variáveis. Os dados foram tratados na planilha eletrônica para o planejamento Doehlert, desenvolvido por Teófilo e Ferreira (2006)⁷⁸ e as superfícies de resposta foram construídas no Statistica 10.

Tabela 5. Níveis das variáveis temperatura de dessolvatação e voltagem do capilar para o planejamento Doehlert.

Níveis		-1	-0,866	-0,5	0	0,5	0,866	1
Variáveis	Temperatura de dessolvatação (°C)	450	-	487,5	525	562,5	-	600
	Voltagem do capilar (kV)	-	2	-	2,75	-	3,5	-

* Os valores de temperatura foram arredondados para 488 e 562 para serem inseridos no equipamento.

Tabela 6. Níveis das variáveis energia de colisão (EC) e voltagem do cone (VC) para o planejamento Doehlert.

Níveis		-1	-0,866	-0,5	0	0,5	0,866	1
Variáveis	EC	15	-	18,75	22,5	26,25	-	30
	VC	-	20	-	30	-	40	-

* Os valores de energia de colisão foram arredondados para 19, 22 e 26 para serem inseridos no equipamento.

Para o planejamento com as variáveis comuns aos analitos (voltagem do capilar e temperatura de dessolvatação), utilizou-se a função desejabilidade para encontrar uma condição ótima para os cinco analitos. Nesse procedimento as respostas do planejamento são convertidas em valores entre 0 e 1 denominados desejabilidades individuais, d_i , (Equação 7). O valor 0 representa uma resposta indesejável e o valor 1, o oposto. A partir delas é calculada uma desejabilidade global, D , (Equação 8) que é uma média geométrica dos valores de d_i .⁸⁰

$$d_i = \begin{cases} 0 & \text{se } y < L \\ \left(\frac{y-L}{T-L}\right)^s & \text{se } L \leq y \leq T \\ 1 & \text{se } y > T \end{cases} \quad \text{Equação 7}$$

Onde y é a resposta monitorada, L e T são a menor resposta aceitável e a resposta alvo respectivamente. Sendo possível atribuir um peso (s) para a resposta.

$$D = \sqrt[m]{d_1 \times d_2 \times \dots \times d_m} \quad \text{Equação 8}$$

Onde m é o número da m ésima desejabilidade individual.

3.7 Procedimento geral para montagem do sistema de eletroextração

O preparo de amostra assistido por campos elétricos empregou o sistema multipoços desenvolvido por Orlando *et al.* (2017, 2019)^{30,31}. Esse sistema (**Figura 5**) é constituído basicamente de um suporte de microtubos vazado (1) com uma tela metálica (eletrodo inferior) (2) fixada na parte inferior; uma placa suporte para a fase acceptora com uma tela metálica (3) afixada; e uma placa metálica superior (eletrodo superior) (4). Nos poços do suporte vazado são posicionados os microtubos modificados com um parafuso que é responsável pelo contato elétrico com a tela inferior. Na placa suporte da fase acceptora, são posicionados os papéis cortados em formato retangular com um triangulo na ponta, a tela afixada é responsável pelo contato elétrico entre os papéis e a placa metálica superior. A placa suporte foi desenvolvida, neste trabalho, para acomodação dos papeis, já que no primeiro sistema cones odontológicos eram utilizados como suporte do eletrólito da fase acceptora e eram posicionados diretamente em pequenos orifícios circulares presentes na placa metálica superior.

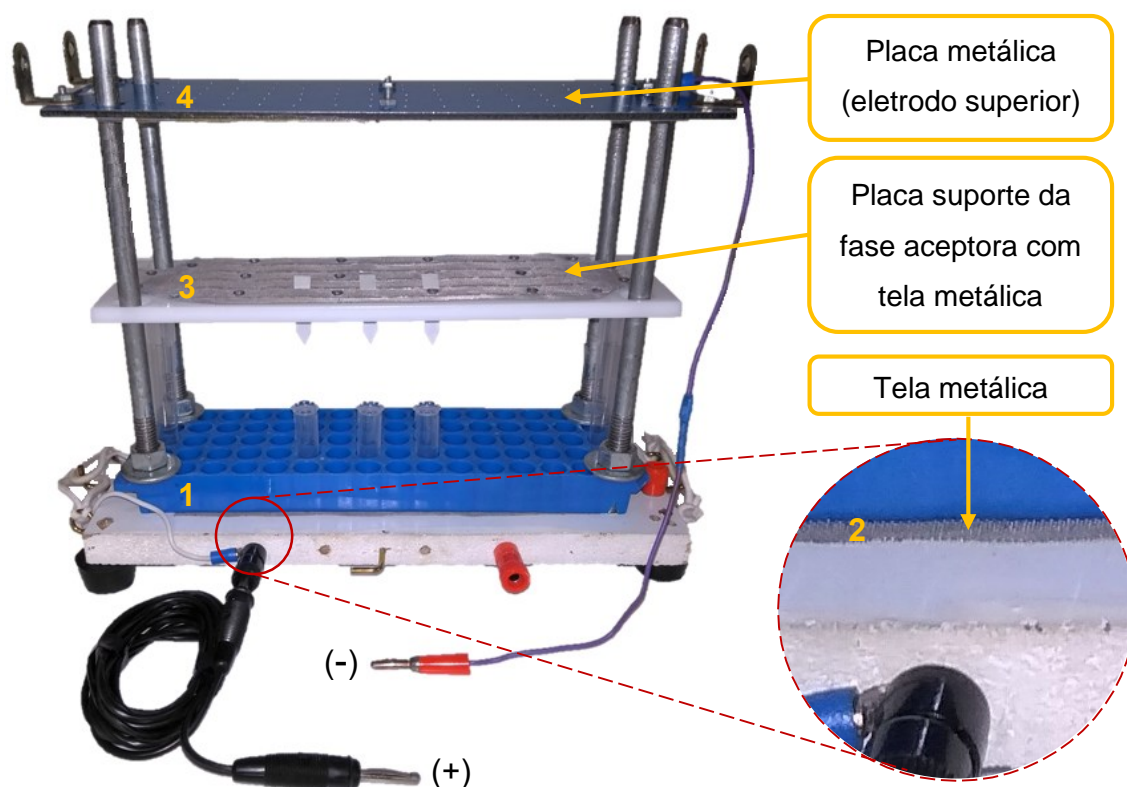


Figura 5. Sistema multipoços de eletroextração. (Os sinais dos polos elétricos como estão mostrados referem-se às extrações dos analitos antidepressivos que se encontravam predominantemente catiônicos).

Nos microtubos foram colocados, nessa ordem: a fase doadora constituída de 1000 μL de uma mistura 1:1 (v/v) de acetonitrila e de solução dos cinco analitos a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em acetato de amônio 50 mmol L^{-1} pH 6,50 (ou em saliva artificial pH 6,70); o filtro orgânico (750 μL de 1-octanol) e a fase aceptora embebida em eletrólito (papel cromatográfico 1 Chr adicionado de 70 μL de solução de ácido acético 400 mmol L^{-1}). No momento da extração, a base suporte para os papéis foi posicionada até encostar na borda dos microtubos, dessa forma a ponta dos papéis ficaram dentro do filtro orgânico com cerca de 3 mm da interface entre a fase doadora e o filtro. E a placa metálica foi posicionada logo acima da base dos papéis. Ambos os eletrodos foram conectados a uma fonte de eletroforese a 300 V. Como os analitos são catiônicos, o eletrodo inferior foi conectado ao polo positivo e o superior ao polo negativo da fonte. O tempo de extração foi de 10 minutos. A **Figura 6** é uma representação simplificada do processo de eletroextração, mostrando as fases do sistema descritas acima.

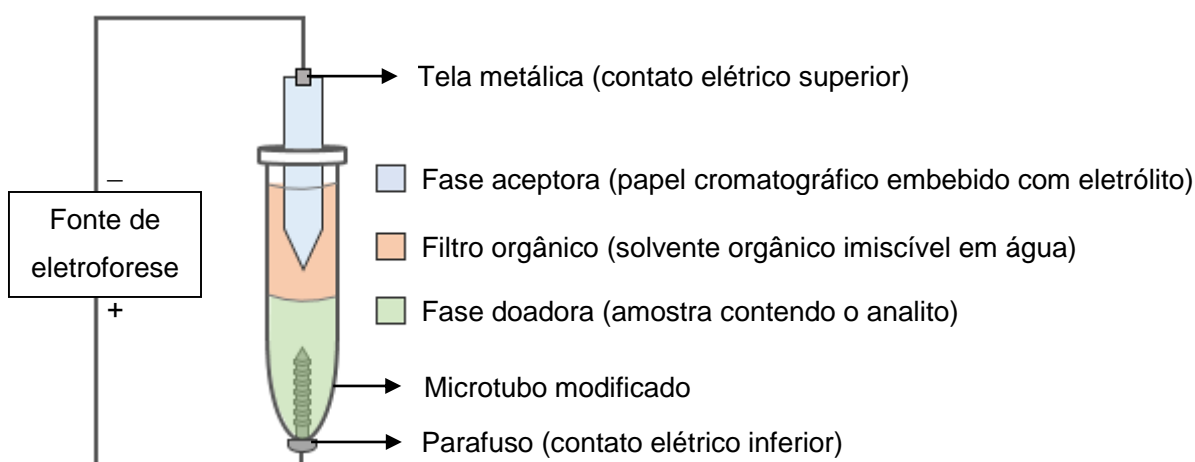


Figura 6. Representação simplificada do sistema de eletroextração. Polos elétricos representados para extração de analitos catiônicos.

Após a eletroextração, os analitos foram dessorvidos da fase aceptora. Para isso, o papel foi colocado em um microtubo de polipropileno, então adicionou-se 25 μL de isopropanol em ambos os lados do papel. Depois 500 μL de solução de dessorção (MeOH: ACN: HAc, 47,5: 47,5: 5 v/ v/ v) foi adicionada ao microtubo que foi agitado no vórtex por 30 segundos a 2000 rpm e sonicado em banho de ultrassom por 10 minutos. Então foram recolhidos cerca de 100 μL da solução para serem injetados no UPLC-MS/MS. Essa mesma quantidade foi recolhida da fase doadora e do filtro orgânico e esse último foi diluído cinco vezes em acetonitrila antes da injeção.

Todos os testes foram conduzidos em triplicata e na possível necessidade de retirada de *outliers*, utilizou-se o teste de Grubbs com nível de confiança de 95%.

Apenas como prova de conceito, foi realizada uma triplicata de extração de corante catiônico violeta genciana a 2 mg L^{-1} na fase doadora composta por tampão McIlvanine pH 3 e ACN 1:1 v/v, tempo de extração de 3 minutos e uma diferença de potencial de 300 V. As demais fases foram utilizadas como descrito anteriormente.

3.8 Avaliação do solvente de dessorção

Para realizar a análise das amostras por UHPLC-MS/MS, após a eletroextração os analitos precisam ser dessorvidos do papel cromatográfico. Para isso dez diferentes misturas de solvente foram avaliadas buscando o maior sinal analítico. São eles: água; metanol; água: ácido acético (95: 5, v/v); metanol: ácido acético, (95: 5, v/v); água: metanol: ácido acético (47,5: 47,5: 5, v/v/v); água: acetonitrila: ácido acético, (47,5: 47,5: 5 v/v/v); água:

tetrahidrofurano: ácido acético (47,5: 47,5: 5, v/v/v); metanol: acetato de sódio 100 mmol L⁻¹ (50:50, v/v); metanol: acetato de amônio 100 mmol L⁻¹ (50:50 v/v) e metanol: acetonitrila: ácido acético (47,5: 47,5: 5 v/v/v). As etapas de eletroextração e dessorção seguiram o procedimento descrito na seção 3.7.

3.9 Estudo univariado das condições que afetam a eletroextração

Estudos prévios dos fatores que afetam a eletroextração foram avaliados e conduzidos conforme descrito na seção 3.7. As possíveis alterações necessárias para cada estudo estão descritas a seguir:

3.9.1 Efeito do campo elétrico: teste inicial

Comparou-se as extrações de TCAs com e sem a presença de campo elétrico. Para as extrações sem campo, o sistema foi montado, mas o potencial não foi aplicado (n = 3 para a extração com e sem campo).

3.9.2 Comparação entre solução tampão e saliva artificial como fases doadoras

Neste estudo comparou-se a performance de extração de TCAs de dois grupos de amostras: um com a fase doadora constituída da mistura de saliva artificial (preparada conforme a seção 3.3.2) fortificada com TCAs (1 µg mL⁻¹) e ACN 1:1 (v/v), e outro com a fase doadora constituída da solução de TCAs (1 µg mL⁻¹) preparada em NH₄Ac (50 mmol L⁻¹) e diluída com ACN 1:1(v/v).

3.9.3 Efeito do eletrólito da fase acceptora

Foram testadas as soluções da fase acceptora compostas por ácido acético (HAc) 400 mmol L⁻¹, ácido fórmico (HCOOH) 400 mmol L⁻¹ e ácido clorídrico (HCl) 10 mmol L⁻¹ individualmente (n = 3 para cada eletrólito).

3.9.4 Efeito do tipo de papel da fase acceptora

Foram avaliados dois tipos de papel cromatográfico usado como fase acceptora. Os tipos 1 Chr e 3MM Chr testados são ambos constituídos de celulose e têm espessuras de 0,18 mm e 0,34 mm, respectivamente (n = 3 para cada papel).

3.9.5 Efeito do solvente orgânico presente na fase doadora

Os solventes ACN, MeOH e EtOH foram testados na fase doadora na proporção 1:1 (v/v) com a solução de TCAs ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) preparada em acetato de amônio NH_4Ac (50 mmol L^{-1}) ($n = 3$ para cada solvente avaliado).

3.9.6 Efeito da presença de carreador no filtro orgânico

A curcumina foi testada como carreador, sendo dissolvida diretamente em 1-octanol atingindo a concentração de 0,1% (m/v) sendo essa solução utilizada como filtro orgânico ($n = 3$ para a extração com e sem curcumina).

3.10 Estudo multivariado das condições que afetam a eletroextração

Foram realizados dois planejamentos experimentais para a otimização do preparo de amostra assistido por campos elétricos sendo um deles para encontrar a melhor composição do filtro orgânico (planejamento de misturas ternário do tipo rede simplex) e o outro para encontrar os melhores níveis de tempo de extração, potencial elétrico aplicado e percentual de orgânico na fase doadora (planejamento Box-Behnken). Entre esses planejamentos foi realizada uma avaliação da recuperação dos analitos frente à precipitação proteica decorrente da adição de acetonitrila à amostra de saliva real (seção 3.10.2). Em ambos os planejamentos se utilizou a saliva artificial na fase doadora.

3.10.1 Planejamento de misturas para a otimização da composição do filtro orgânico

O modelo de um planejamento de misturas pode ser do tipo linear, quadrático ou cúbico dependendo do número de experimentos que se deseja realizar. A Equação 9 fornece o número de experimentos (lado direito da igualdade) a serem realizados de acordo com o número de variáveis (k) e com o grau do polinômio (m) a ser ajustado.⁸¹

$$\binom{m+k-1}{m} = \frac{(m+k-1)!}{(k-1)!m!} \quad \text{Equação 9}$$

Um planejamento de misturas ternário do tipo rede simplex foi realizado para estudar a melhor composição do filtro orgânico para a extração de TCAs. Nesse planejamento 6 experimentos são requeridos visando um ajuste de modelo quadrático ($m = 2$). Os solventes

testados foram três solventes já descritos na literatura para sistemas de eletroextração: 1-octanol, 2-etilhexanol e acetato de etila. Exclusivamente para esse experimento o percentual de solvente orgânico adicionado à fase doadora foi reduzido para 25% v/v. O arranjo de experimentos está na **Tabela 7** e cada um deles foi realizado em triplicata ($n = 3$). Os dados foram tratados no *software* Design Expert 11 e os resultados apresentados em termos da função desejabilidade.

Tabela 7. Configuração do planejamento de misturas rede simplex de 3 componentes para otimização da composição do filtro orgânico para a extração de TCAs.

Experimentos	Níveis		
	1-octanol	2-etilhexanol	Acetato de etila
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	0,5	0,5	0
5	0,5	0	0,5
6	0	0,5	0,5

3.10.2 Efeito da precipitação proteica na recuperação de TCAs

Para avaliar uma possível perda de analito com a precipitação de proteínas em saliva real após a adição de acetonitrila, fortificou-se dois conjuntos distintos de amostras de saliva. Em um deles, como de costume, a fortificação com os TCAs foi realizada antes da adição de acetonitrila. E em outro conjunto de amostras, adicionou-se primeiramente a acetonitrila e após a precipitação proteica, o sobrenadante foi fortificado com TCAs. Para ambos os grupos de amostras a concentração de fortificação de TCAs usada foi de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os dois conjuntos foram extraídos e analisados por UHPLC-MS/MS.

3.10.3 Planejamento Box-Behnken para otimização das condições de eletroextração

O planejamento Box-Behnken é um modelo quadrático de fórmula geral $N = 2k(k - 1) + PC$, onde N é o número de experimentos a ser realizado, k é o número de variáveis estudadas e PC é o ponto central. Esse planejamento é usado para otimização de pelo menos 3 fatores, que são avaliados em três níveis. Como o arranjo de experimentos não contempla simultaneamente as variáveis em seus níveis extremos (exemplo, $-1, -1, -1$), não se tem informações a respeito desses pontos, o que pode ser uma desvantagem quando se precisa trabalhar em condições extremas.⁷⁹ Esse, porém não é o caso do presente estudo.

Realizou-se um planejamento Box-Behnken para as variáveis: tempo de extração, potencial elétrico e percentual de orgânico na fase doadora (% Org FD), cujos níveis experimentais estão dispostos na **Tabela 8**.

Tabela 8. Níveis das variáveis potencial elétrico, tempo e percentual de orgânico avaliados no planejamento Box-Behnken para otimização da eletroextração de TCAs.

Variáveis	Níveis		
	-	0	+
Potencial (V)	50	175	300
Tempo (min)	2	10	18
% Org FD (v/v)	0	25	50

% Org FD = porcentagem (v/v) de solvente orgânico na fase doadora.

Cada experimento foi realizado em triplicata ($n = 3$) e o ponto central em quintuplicata ($n = 5$). Na **Tabela 9** encontram-se os valores de cada variável correspondentes aos experimentos realizados. Os dados foram tratados no software Design Expert 11 e os resultados expressos em termos da função desejabilidade.

Tabela 9. Valores das variáveis potencial elétrico, tempo e percentual de solvente orgânico na fase doadora (% Org FD) para os 13 experimentos do planejamento Box-Behnken para a otimização da eletroextração de TCAs.

Exp	Potencial (V)	Tempo (min)	% Org FD (v/v)
1	50	2	25
2	300	2	25
3	50	18	25
4	300	18	25
5	50	10	0
6	300	10	0
7	50	10	50
8	300	10	50
9	175	2	0
10	175	18	0
11	175	2	50
12	175	18	50
PC	175	10	25

3.11 Cálculo do percentual de analitos presentes em cada fase

Os resultados obtidos nos estudos de otimização da eletroextração foram reportados como percentuais de quantidade de matéria dos TCAs que foram calculados com base nas áreas dos picos cromatográficos dos analitos nas três fases do sistema após a eletroextração. As áreas provenientes da análise direta de uma solução de TCAs a $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ em solvente de dessorção foi utilizada como referência, representando a quantidade total de TCAs adicionada ao sistema, para estimar a quantidade de matéria de TCAs em cada uma das fases. Para o cálculo do percentual de extração, primeiro foi estimada a quantidade de TCAs em cada fase, levando em consideração o seu volume final: 0,75 mL para a FD (fase doadora), 1 mL para o FO (filtro orgânico) e 0,55 mL para a FA (fase aceptora). Esses foram os volumes finais observados após parte do filtro orgânico se misturar com a fase doadora e vice-versa. De posse da quantidade de matéria de TCAs calculou-se o percentual de extração conforme a Equação 10.

$$\%E = \frac{n_{TCA} \text{ na FI após a EE}}{n_{TCA} \text{ na solução de referência}} \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

Onde $\%E$ é o percentual de extração, n_{TCA} é a quantidade de matéria de TCAs e a fase de interesse (*FI*) pode ser a aceptora, o filtro orgânico ou a fase doadora.

3.12 Validação do método

Após a otimização das condições do espectrômetro de massas e da eletroextração o método foi validado utilizando a saliva artificial, empregando na eletroextração 300 V por 10 minutos com 50% v/v de ACN na fase doadora e as condições descritas nas seções 3.4 para a cromatografia e 4.2 para a espectrometria de massas.

Os ensaios de validação do método utilizado seguiram as diretrizes do guia da Eurachem⁸², com algumas modificações. Os parâmetros avaliados, bem como a maneira pela qual eles foram estimados estão dispostos a seguir:

3.12.1 Seletividade

A amostra de saliva artificial sem a presença dos analitos foi submetida aos processos de extração, dessorção e posterior injeção no UPLC-MS/MS.

3.12.2 Efeito matriz

Foram construídas três curvas, uma em solvente de dessorção e outras duas no extrato da matriz real ou artificial, contendo os analitos na faixa de 2 a 12 ng mL⁻¹. Foram realizadas triplicatas para cada nível de fortificação. Para a curva em solvente, fortificou-se diretamente o solvente de dessorção (MeOH: ACN: HAc) com volumes adequados de uma solução de TCAs a 50 ng mL⁻¹ nesse mesmo solvente. Para as curvas no extrato da matriz, realizou-se a extração de amostras branco contendo a saliva artificial ou a saliva real e após a dessorção, volumes variados dessa mistura foram fortificados com quantidades adequadas da solução de 50 ng mL⁻¹ totalizando, para cada amostra, um volume final de 300 µL. A comparação da inclinação das curvas foi realizada através dos testes F (Fisher-Snedecor) e t (Student) ao nível de confiança de 95%.

3.12.3 Linearidade

Foi construída uma curva matrizada e extraída, em triplicata, nos níveis de fortificação: 2, 4, 6, 8, 10 e 12 ng mL⁻¹ na saliva artificial. Foram realizados os testes para detecção de *outliers* de Jackknife, de linearidade através da ANOVA e de homocedasticidade de Brown Forsythe, seguindo a metodologia de Souza e Junqueira (2005).⁸³

3.12.4 Limites de detecção e quantificação

Para a determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), foram realizadas extrações de 10 amostras branco de saliva artificial. E após a dessorção, volumes variados dessa solução foram fortificados com 0,5 ng mL⁻¹ de TCAs, totalizando um volume de 300 µL para cada amostra que foram injetados no UPLC-MS/MS. Os valores de LD e LQ foram estimados, respectivamente, pela Equação 11 e Equação 12.

$$LD = 3s'_0 \quad \text{Equação 11}$$

$$LQ = 10s'_0 \quad \text{Equação 12}$$

Onde s'_0 é dado pela Equação 13:

$$s'_0 = \frac{s_0}{\sqrt{n}} \quad \text{Equação 13}$$

s_0 é o desvio padrão das concentrações encontradas para o extrato do branco fortificado e n é o número de amostras branco analisadas.

3.12.5 Precisão intra e interdias

A precisão foi estimada em três pontos da curva analítica (2, 6 e 10 ng mL⁻¹) a partir de uma sextuplicata de extração em cada um desses pontos, que foi realizada no mesmo dia para a precisão intradia (repetitividade) e em dois dias consecutivos para a precisão interdias, ou precisão intermediária. Os resultados foram expressos pelo coeficiente de variação (CV), calculado através da Equação 14:

$$CV = \frac{s}{C_{TCA} \text{média}} \times 100 \quad \text{Equação 14}$$

Onde s é o desvio padrão das concentrações de TCAs encontradas e C_{TCA} é a concentração de TCAs encontrada.

3.12.6 Recuperação

O ensaio de recuperação foi realizado avaliando uma sextuplicata de extração em três pontos da curva analítica (2, 6 e 10 ng mL⁻¹). O percentual de recuperação foi estimado pela Equação 15:

$$R = \frac{C_{TCA} \text{ encontrada}}{C_{TCA} \text{ adicionada}} \times 100 \quad \text{Equação 15}$$

Onde R é a recuperação e C_{TCA} é a concentração de TCAs.

3.12.7 Eficiência de extração

A eficiência de extração foi estimada em três pontos da curva (2, 6 e 10 ng mL⁻¹). Fez-se uma sextuplicata de extração do branco da matriz e também da matriz fortificada nos níveis já mencionados. Após a dessorção fortificou-se os brancos com TCAs a 50 ng mL⁻¹ para um volume final de 300 µL. Após a análise por UHPLC-MS/MS usou-se a Equação 16 para calcular a eficiência de extração, $E_f E$, para cada uma das concentrações:

$$E_f E = \frac{\text{Área do analito extraído}}{\text{Área do analito adicionado após EE}} \times 100 \quad \text{Equação 16}$$

3.12.8 Comparação entre amostras de saliva de diferentes voluntários

Salivas provenientes de 10 voluntários sadios (cinco mulheres e cinco homens), com idades entre 21 e 30 anos, foram submetidas ao método para avaliar a influência da matriz de acordo com a variação da amostra. As amostras de saliva foram recolhidas com pelo menos meia hora após a alimentação e/ou escovar os dentes⁸⁴ e foram fortificadas com TCAs na concentração de 6 ng mL⁻¹ antes da extração, seguida pela dessorção e injeção no UPLC-MS/MS.

3.13 Utilização da técnica de PS-MS como triagem para análise de TCAs em fluido oral

A ionização por *paper spray* é uma forma recente de ionização ambiente apresentada pela primeira vez em 2010,⁸⁵ e que vem sendo muito utilizada desde então, devido a sua simplicidade, eficiência e baixo custo.⁸⁶ Na técnica PS-MS, um triângulo de papel cromatográfico com a amostra é posicionado em frente à entrada do espectrômetro de massas. Depois uma quantidade de solvente é adicionada ao papel e então é aplicada uma diferença de potencial entre o papel e o espectrômetro fazendo com que seja gerado um *spray* na ponta do papel. Esse *spray* é responsável pela entrada dos analitos no espectrômetro de massas para que sejam analisados. O mecanismo da ionização por *paper spray* é semelhante ao da ionização por *electrospray* mas sem a presença de um gás auxiliar⁸⁷

O procedimento de eletroextração utilizando papel cromatográfico abordado neste trabalho pôde ser acoplado de forma direta com a PS-MS, uma vez que o formato do papel usado como fase acceptora tem uma ponta triangular requerida para o *paper spray*. Visando uma melhoria no posicionamento do papel tanto no momento da eletroextração quanto no *paper spray*, uma nova configuração da eletroextração foi testada para extração dos TCAs e posterior análise direta da fase acceptora por PS-MS. Nessa configuração a fase acceptora foi suportada em um recipiente tubular (ponta de ponteira) e ajustada acima do recipiente da amostra, de forma direta, ou seja, em um furo na própria tampa do microtubo ou em uma base com furos circulares. Na **Figura 7** está representado o sistema usando essa nova configuração. Além da placa metálica superior, foi necessário a utilização de um eletrodo, representado nesse trabalho por uma esfera e uma mola metálicas, para promover o contato elétrico entre a fase acceptora e o polo negativo da fonte de potencial.

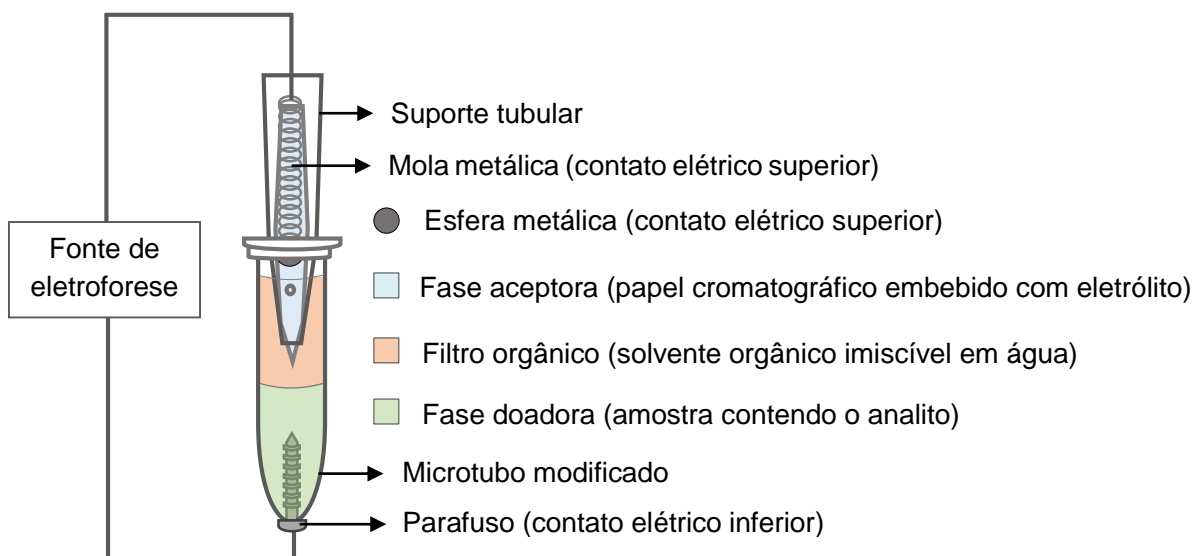


Figura 7. Representação do sistema de eletroextração usando a configuração da fase aceitadora suportada em um recipiente tubular. Polos elétricos representados para extração de analitos catiônicos.

A extração foi conduzida utilizando as condições otimizadas para a eletroextração. Uma triplicata de extração de TCAs ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi realizada para ser analisada no UHPLC-MS/MS e, portanto, após a eletroextração seguiu-se com as etapas de desorção. Outra triplicata de extração de TCAs ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$) e do padrão interno ciclobenzaprina ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi realizada, e ao final, a fase aceitadora juntamente com seu suporte e eletrodo foi levada para a análise por PS-MS. As condições dessa análise estão dispostas na **Tabela 10**.

Tabela 10. Parâmetros de análise de TCAs por PS-MS.

Parâmetro	Valor
Voltagem do capilar (V)	43
Potencial (kV)	4
Temperatura do capilar ($^{\circ}\text{C}$)	275
Lentes (V)	85
Tempo de aquisição (min)	0,2

O suporte da fase aceitadora foi encaixado em uma base afixada em um suporte com movimentação 3D, posicionado em frente ao espectrômetro de massas, de modo que o papel ficasse direcionado à entrada do cone do equipamento a uma distância de 0,5 cm. Após esses ajustes 50 μL de uma mistura de metanol: isopropanol (95,5:4,5 v/v) com 0,1% de ácido fórmico foi adicionado pelo orifício presente no suporte tubular e então o potencial foi aplicado

entre o espectrômetro e o papel utilizando um fio de cobre como contato elétrico. A imagem que ilustra o processo de ionização por *paper spray* está na **Figura 8**.

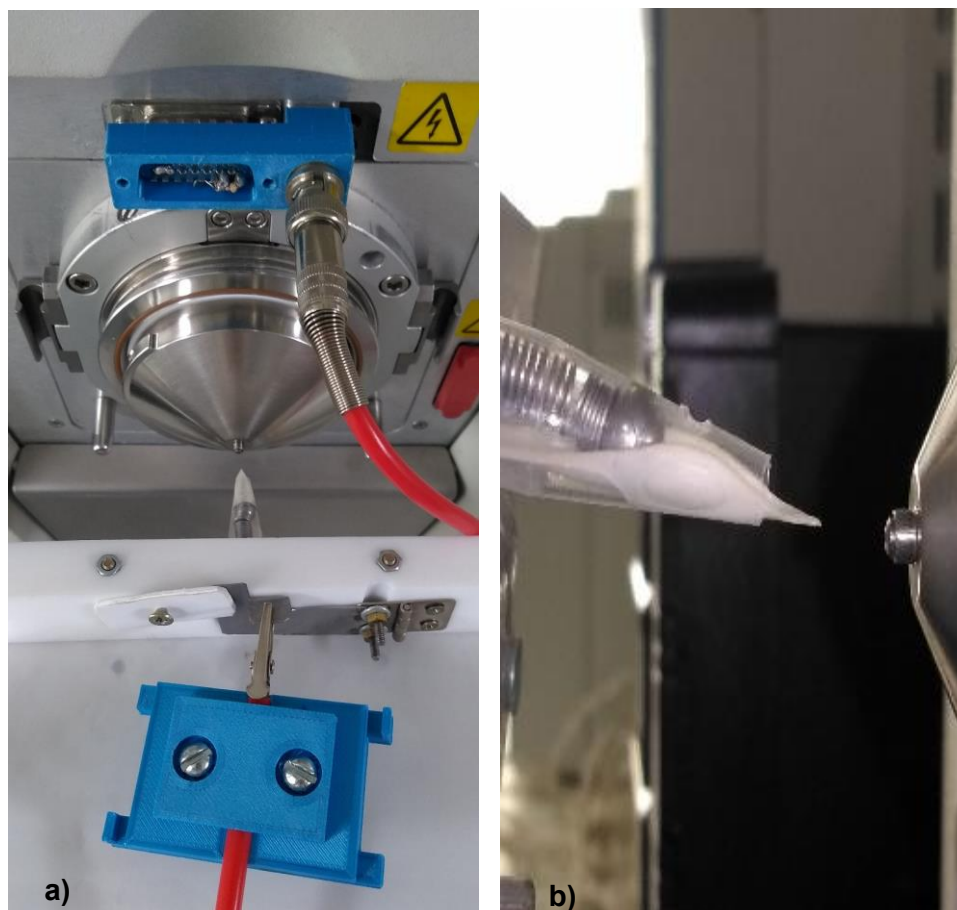


Figura 8. Foto com visão superior da montagem da fonte de ionização por *paper spray* em (a). Visão lateral da posição da fase aceptora suportada em frente à entrada do espectrômetro de massas em (b).

3.14 Perfil de corrente elétrica

Para conhecer o perfil da corrente elétrica do sistema de eletroextração para os TCAs, uma extração dos analitos a 12 ng mL^{-1} em saliva artificial foi realizada com o multímetro ligado em série com o sistema de eletroextração e a fonte de eletroforese. E os registros de corrente ao longo do tempo de extração de 10 minutos foram gravados. As condições de extração empregadas foram as otimizadas após os estudos sobre o sistema de eletroextração.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Triagem das condições de análise no espectrômetro de massas através do planejamento fracionário 2_{III}^{13-9}

Os parâmetros de análise no espectrômetro de massas associados a partes distintas do equipamento não devem apresentar uma influência combinada sobre o sinal analítico, de modo que as possíveis interações entre esses parâmetros devem resultar em efeitos não significativos fazendo com que os contrastes de cada variável tenham uma contribuição maior do efeito individual dessa variável. Dessa forma, o planejamento fracionário é uma boa opção para esse estudo de triagem, já que o interesse é apenas conhecer os efeitos principais de maiores significâncias. A resposta utilizada no planejamento foi a área dos picos cromatográficos dos TCAs.

Da **Figura 9** a **Figura 13** estão os gráficos de Pareto dos cinco analitos para um nível de confiança de 95%. As barras que ultrapassam a linha expressam os fatores considerados significativos e as que não ultrapassam, o contrário.

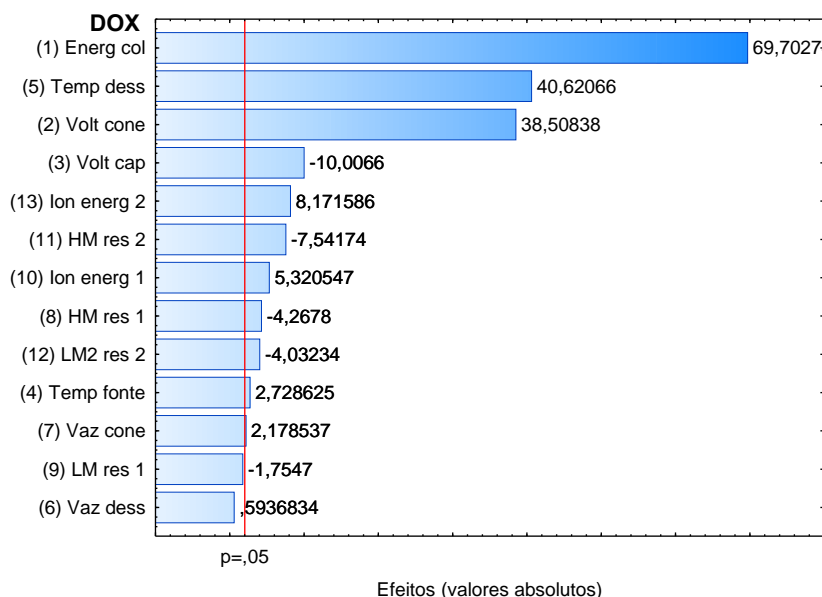


Figura 9. Gráfico de Pareto para a doxepina. (1) = energia de colisão/ V, (2) = voltagem do cone/ V, (3) = voltagem do capilar/ kV, (4) = temperatura da fonte/ °C, (5) = temperatura de dessolvatação/ °C, (6) = vazão do gás de dessolvatação/ L h⁻¹, (7) = vazão do gás do cone/ L h⁻¹, (8) = *high mass resolution* 2, (9) = *low mass resolution* 1, (10) *Ion energy* 1, (11) = *high mass resolution* 2, (12) = *low mass 2 resolution* 2, (13) = *Ion energy* 2.

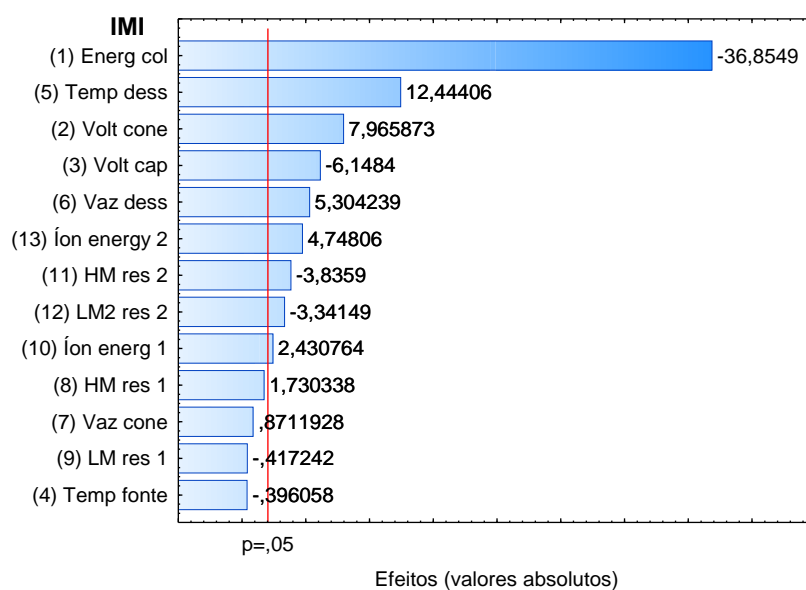


Figura 10. Gráfico de Pareto para a imipramina. (1) = energia de colisão/ V, (2) = voltagem do cone/ V, (3) = voltagem do capilar/ kV, (4) = temperatura da fonte/ °C, (5) = temperatura de dessolvatação/ °C, (6) = vazão do gás de dessolvatação/ L h⁻¹, (7) = vazão do gás do cone/ L h⁻¹, (8) = *high mass resolution* 2, (9) = *low mass resolution* 1, (10) *Ion energy* 1, (11) = *high mass resolution* 2, (12) = *low mass 2 resolution* 2, (13) = *Ion energy* 2.

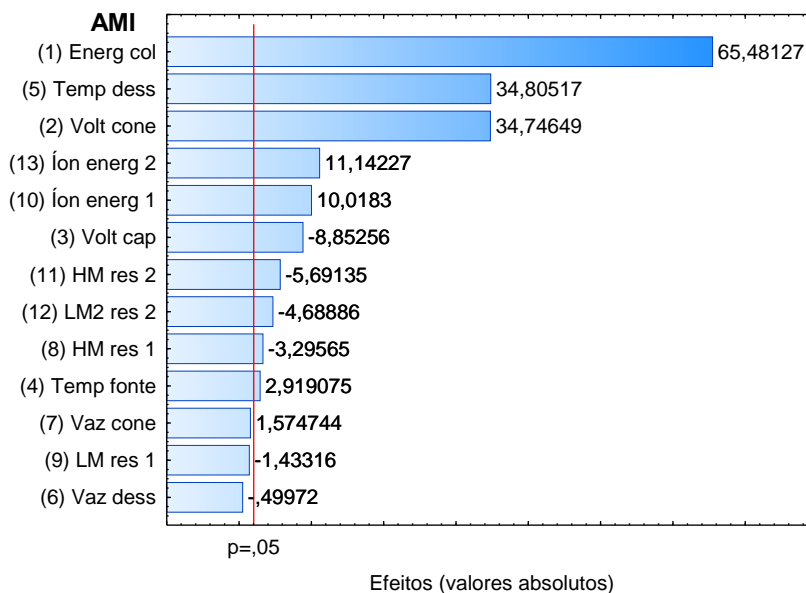


Figura 11. Gráfico de Pareto para a amitriptilina. (1) = energia de colisão/ V, (2) = voltagem do cone/ V, (3) = voltagem do capilar/ kV, (4) = temperatura da fonte/ °C, (5) = temperatura de dessolvatação/ °C, (6) = vazão do gás de dessolvatação/ L h⁻¹, (7) = vazão do gás do cone/ L h⁻¹, (8) = *high mass resolution* 2, (9) = *low mass resolution* 1, (10) *Ion energy* 1, (11) = *high mass resolution* 2, (12) = *low mass 2 resolution* 2, (13) = *Ion energy* 2.

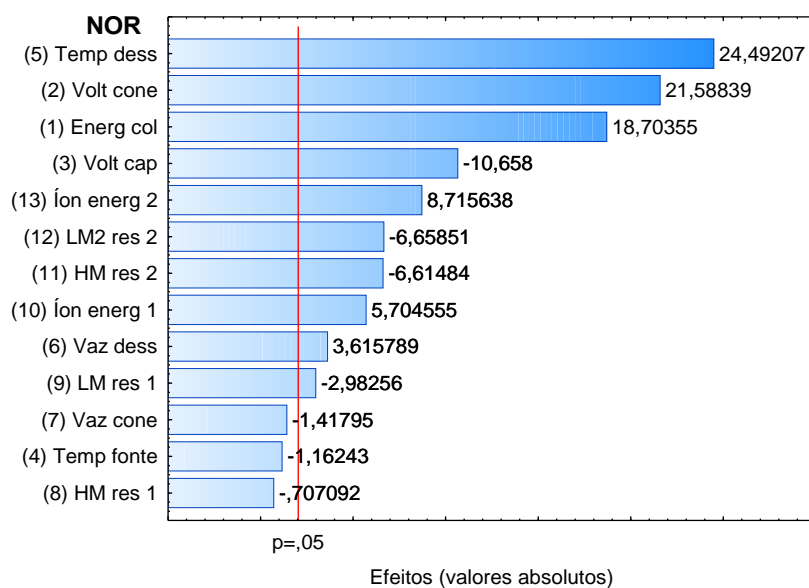


Figura 12. Gráfico de Pareto para a nortriptilina. (1) = energia de colisão/ V, (2) = voltagem do cone/ V, (3) = voltagem do capilar/ kV, (4) = temperatura da fonte/ °C, (5) = temperatura de dessolvatação/ °C, (6) = vazão do gás de dessolvatação/ L h⁻¹, (7) = vazão do gás do cone/ L h⁻¹, (8) = *high mass resolution 2*, (9) = *low mass resolution 1*, (10) *Ion energy 1*, (11) = *high mass resolution 2*, (12) = *low mass 2 resolution 2*, (13) = *Ion energy 2*.

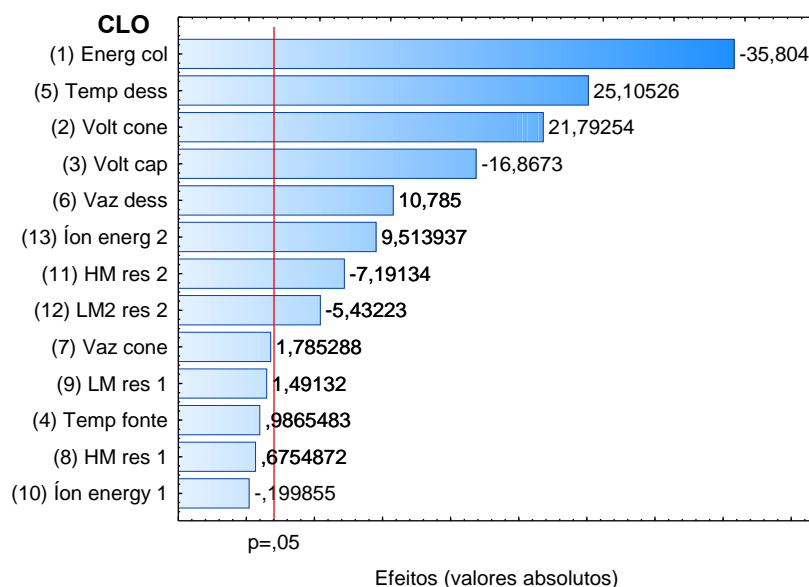


Figura 13. Gráfico de Pareto para a clomipramina. (1) = energia de colisão/ V, (2) = voltagem do cone/ V, (3) = voltagem do capilar/ kV, (4) = temperatura da fonte/ °C, (5) = temperatura de dessolvatação/ °C, (6) = vazão do gás de dessolvatação/ L h⁻¹, (7) = vazão do gás do cone/ L h⁻¹, (8) = *high mass resolution 2*, (9) = *low mass resolution 1*, (10) *Ion energy 1*, (11) = *high mass resolution 2*, (12) = *low mass 2 resolution 2*, (13) = *Ion energy 2*.

Apesar dos analitos apresentarem estruturas similares os efeitos das variáveis estudadas demonstraram graus de influência diferentes para cada um deles, uma vez que os valores dos efeitos e sua significância foram diferentes entre os analitos. De forma comum, mas com exceção da amitriptilina, os quatro primeiros parâmetros mais significativos foram, não necessariamente nesta ordem, voltagem do cone, temperatura de dessolvatação, voltagem do capilar e energia de colisão. Os três primeiros fatores estão diretamente envolvidos na ionização dos analitos na fonte e o último diz respeito à fragmentação das moléculas dos analitos na cela de colisão. Dessa forma, esses parâmetros foram escolhidos para serem otimizados em um próximo planejamento. Os parâmetros pouco significativos ou não significativos, dependendo do analito, foram mantidos nos níveis que geraram maior resposta, ou seja, se o efeito é negativo o valor da condição foi mantido no nível inferior e se é positivo, o contrário. Os valores adotados para os fatores comuns aos analitos estão dispostos na **Tabela 11**.

Tabela 11. Valores adotados para as condições de análise no espectrômetro de massas após o planejamento fracionário 2^{13-9}_{III} .

Variável	Valor adotado
Temperatura da fonte (°C)	150
Vazão do gás de dessolvatação (L h ⁻¹)	900
Vazão do cone (L h ⁻¹)	20
<i>High mass resolution 1</i>	4
<i>Low mass resolution 1</i>	4
<i>Ion energy 1</i>	0,1
<i>High mass resolution 2</i>	4
<i>Low mass 2 resolution 2</i>	4
<i>Ion energy 2</i>	0,6

4.2 Otimização das condições de análise no espectrômetro de massas através do planejamento Doehlert

Depois de conhecer os fatores que mais afetaram a análise de TCAs no espectrômetro de massas, realizou-se dois planejamentos de otimização visando o aumento do sinal analítico. Um deles estudando os parâmetros da fonte de ionização chamado de PD1, planejamento Doehlert 1, e o outro para os parâmetros energia de colisão e voltagem do cone

chamado de PD2, planejamento Doehlert 2. Para o PD1 onde se avaliou a temperatura de dessorção e a voltagem do capilar, optou-se por mudar o domínio experimental para a temperatura de dessolvatação (de 300 a 450 °C para 450 a 600 °C) para avaliar o ganho no sinal analítico com o aumento da temperatura, visto que seu efeito no planejamento anterior foi positivo e muito significativo.

Para a construção dos modelos dos planejamentos utilizou-se os valores médios das áreas dos picos cromatográficos dos TCAs. A significância da regressão e a falta de ajuste dos modelos foram avaliados pela ANOVA, cujos parâmetros estão dispostos na **Tabela 12** para o PD1 e na **Tabela 14** para o PD2.

No PD1, para todos os analitos a regressão foi significativa, com $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$ e não houve falta de ajuste, com $F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$. Com exceção do efeito da interação entre as duas variáveis estudadas, os demais efeitos foram significativos. Os valores dos coeficientes utilizados nos modelos se encontram na **Tabela 13**. As tabelas da ANOVA completas para ambos os planejamentos estão no Apêndice (seções A1 e A2).

Tabela 12. Parâmetros da ANOVA para o modelo ajustado dos parâmetros da fonte de ionização do espectrômetro de massas. Nível de confiança de 95%.

Analito	Significância da regressão		Falta de ajuste		R ²
	F _{cal}	F _{tab} *	F _{cal}	F _{tab} **	
DOX	125,20	4,53	0,01	6,94	98,82
IMI	30,96	4,53	0,31	6,94	95,38
AMI	91,40	4,53	0,46	6,94	98,39
NOR	258,23	4,53	0,03	6,94	99,42
CLO	151,48	4,53	0,08	6,94	99,02

* graus de liberdade da regressão e dos resíduos: 4 e 6; ** graus de liberdade da falta de ajuste e do erro puro: 2 e 4.

Tabela 13. Valores dos coeficientes estimados para o modelo ajustado dos parâmetros da fonte de ionização do espectrômetro de massas. Nível de confiança de 95%.

Fatores	Coeficientes				
	DOX	IMI	AMI	NOR	CLO
Voltagem do capilar (A)	$7,05 \times 10^4$	$2,62 \times 10^5$	$5,5 \times 10^4$	$3,29 \times 10^4$	$1,58 \times 10^5$
Temperatura de dessolvatação (B)	$-5,92 \times 10^4$	$-1,95 \times 10^5$	$-5,4 \times 10^4$	$-3,16 \times 10^4$	$-1,35 \times 10^5$
A²	$-3,62 \times 10^4$	$-1,31 \times 10^5$	$-3,0 \times 10^4$	$-1,89 \times 10^4$	$-8,71 \times 10^4$
B²	$-2,71 \times 10^4$	*	$-2,6 \times 10^4$	$-1,78 \times 10^4$	$-8,33 \times 10^4$

* coeficiente não significativo.

Na **Figura 14** até a **Figura 18** estão as superfícies de resposta e os mapas de contorno referentes ao planejamento Doehlert para otimização dos parâmetros temperatura de dessolvatação e voltagem do capilar.

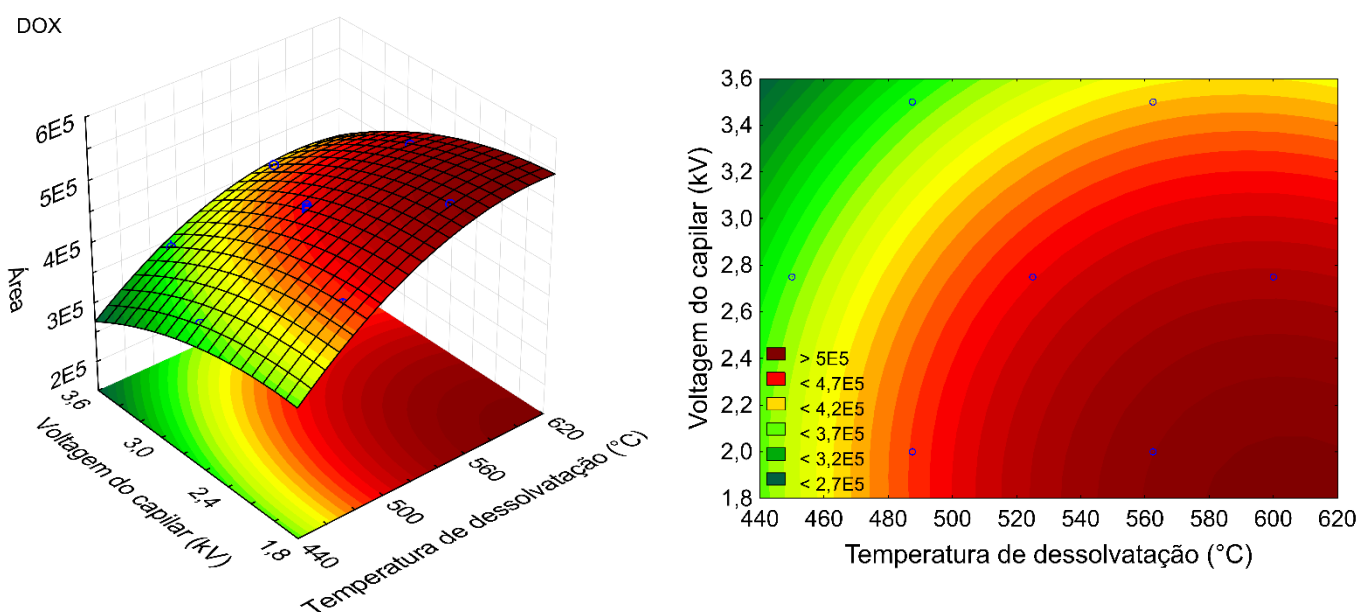


Figura 14. Superfície de resposta e mapa de contorno para a doxepina obtidos pelo planejamento Doehlert dos fatores voltagem do capilar e temperatura de dessolvatação.

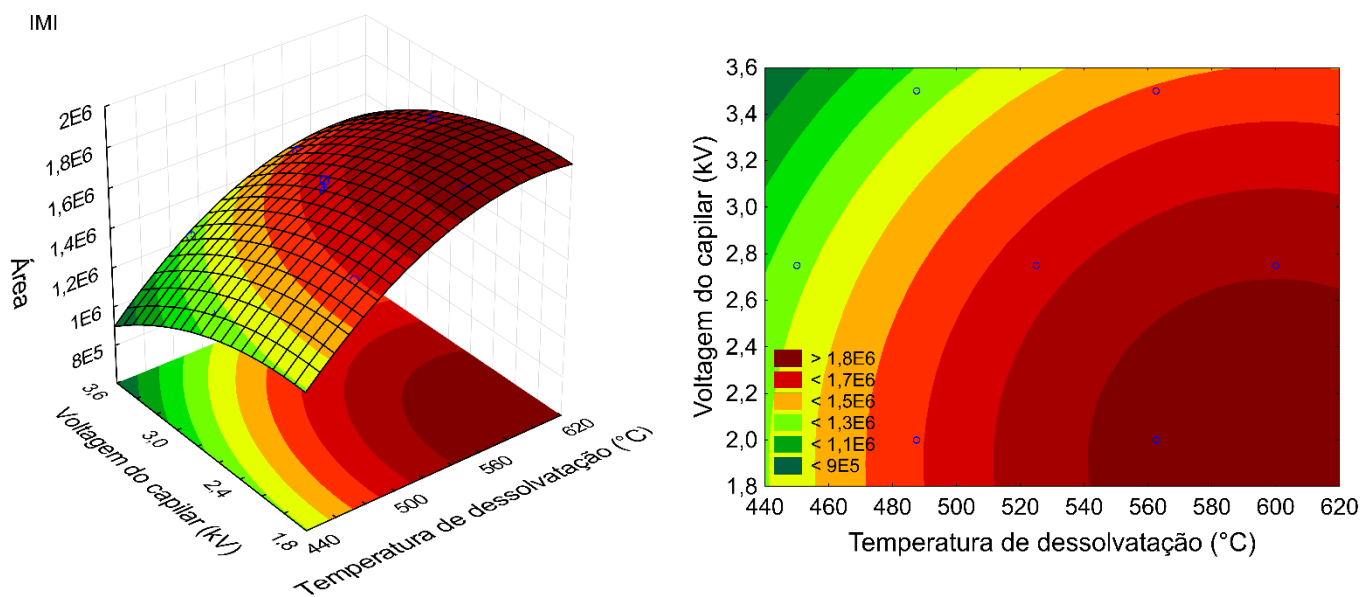


Figura 15. Superfície de resposta e mapa de contorno para a imipramina obtidos pelo planejamento Doehlert dos fatores voltagem do capilar e temperatura de dessolvatação.

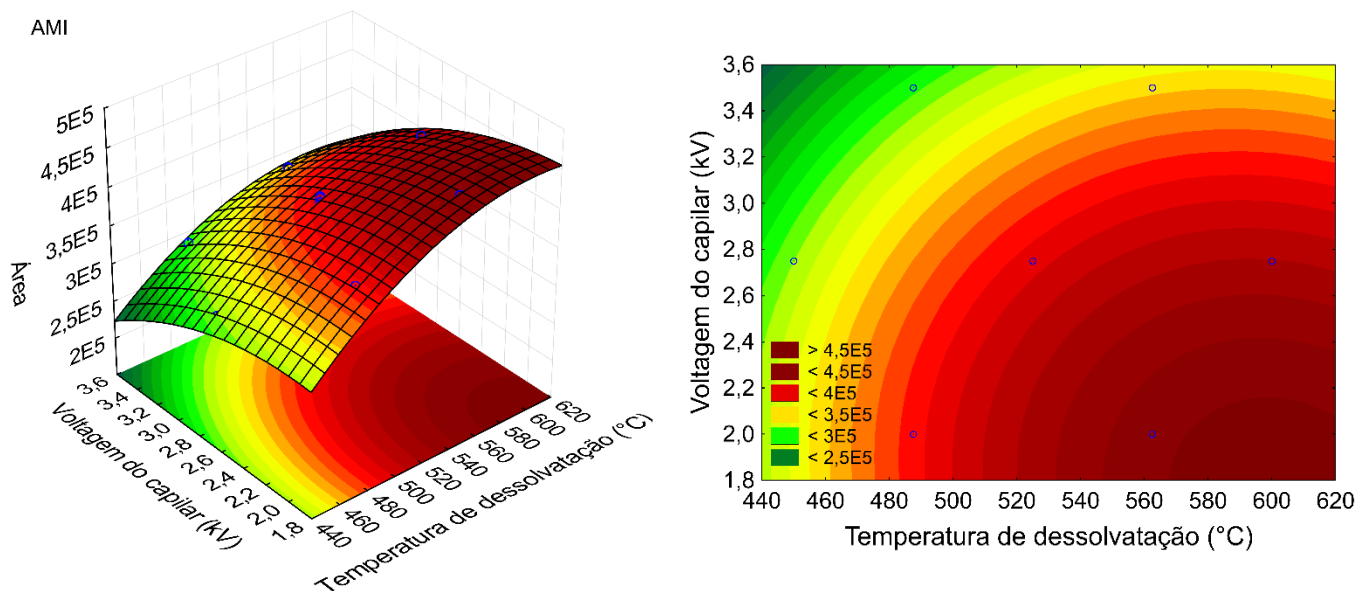


Figura 16. Superfície de resposta e mapa de contorno para a amitriptilina obtidos pelo planejamento Doehlert dos fatores voltagem do capilar e temperatura de dessolvatação.

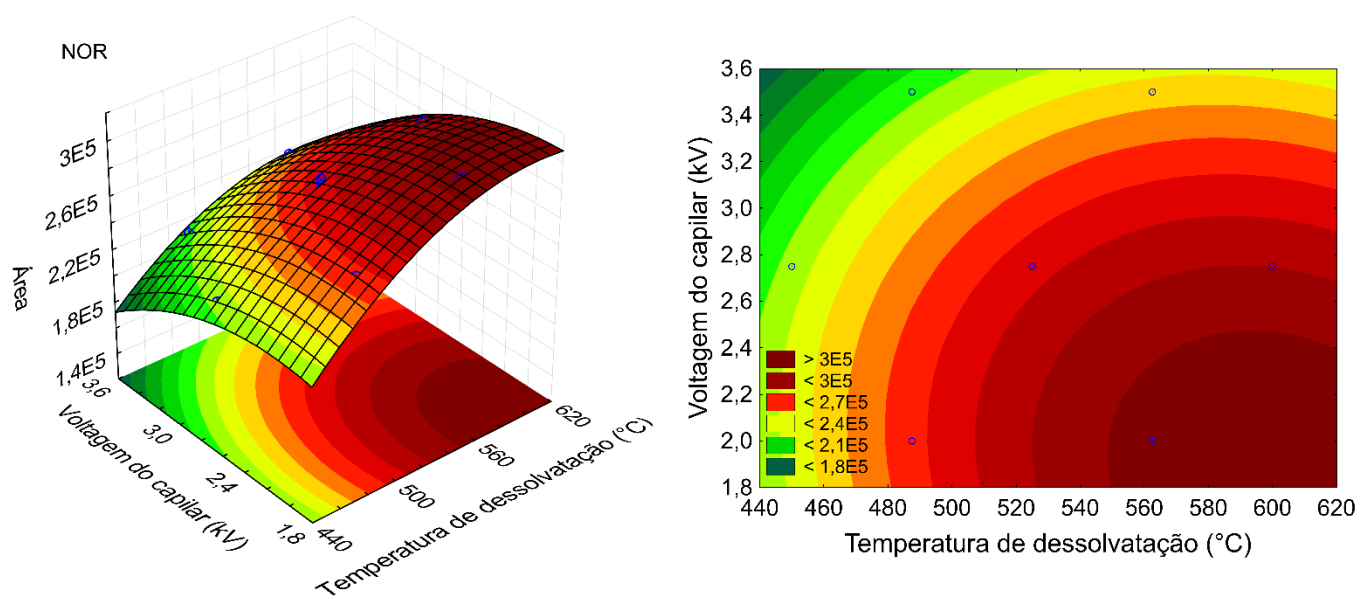


Figura 17. Superfície de resposta e mapa de contorno para a nortriptilina obtidos pelo planejamento Doehlert dos fatores voltagem do capilar e temperatura de dessolvatação.

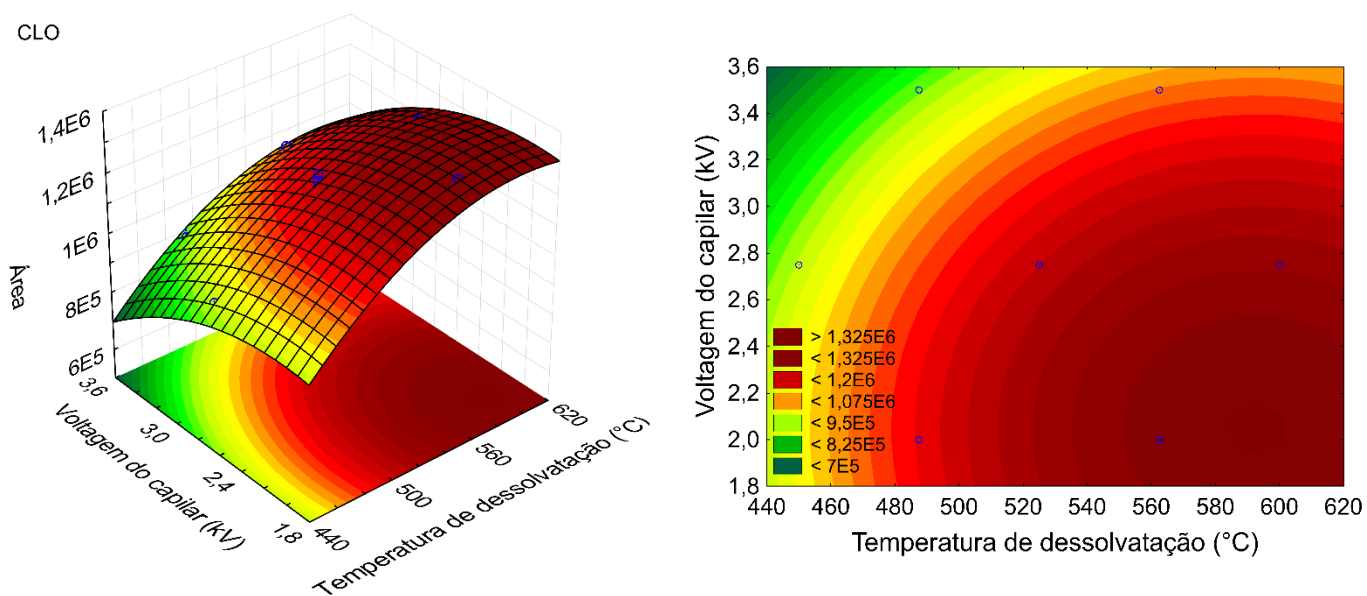


Figura 18. Superfície de resposta e mapa de contorno para a clomipramina obtidos pelo planejamento Doehlert dos fatores voltagem do capilar e temperatura de dessolvatação.

Observando os mapas de contorno de cada um dos analitos, vê-se que ao aumentar a temperatura de dessolvatação e diminuir a voltagem do capilar até certo ponto, o sinal analítico aumenta. Sendo assim, adotou-se as condições de 2 kV para a voltagem do capilar e 560 °C para a temperatura de dessolvatação (desejabilidade global 1), para serem usadas no planejamento de otimização dos parâmetros individuais dos analitos (PD2). Esses parâmetros foram a energia de colisão e a voltagem do cone. Os dados passaram pelo teste da ANOVA (**Tabela 14**), ao nível de confiança de 95%, para significância da regressão e ajuste do modelo. Para os cinco analitos a regressão foi significativa, e para a maioria todos os efeitos foram significativos com exceção do efeito da interação das duas variáveis. Porém houve falta de ajuste para a doxepina e a nortriptilina.

Tabela 14. Parâmetros da ANOVA para o modelo ajustado dos parâmetros energia de colisão e voltagem do cone. Nível de confiança de 95%.

Analito	Significância da regressão		Falta de ajuste		R ²
	F _{cal}	F _{tab*}	F _{cal}	F _{tab**}	
DOX	61,52	4,46	306,26	6,39	93,90
IMI	511,26	5,05	3,67	7,71	99,80
AMI	1511,20	5,05	0,28	7,71	99,93
NOR	68,306	4,35	15,67	6,59	96,70
CLO	3351,09	5,05	0,12	7,71	99,97

*graus de liberdade da regressão e dos resíduos, respectivamente: 2 e 8 para dox, 3 e 7 para nor e 5 e 5 para imi, ami e clo: **graus de liberdade da falta de ajuste e do erro puro: 4 e 4 para dox, 3 e 4 para nor e 1 e 4 para imi, ami e clo.

Mesmo com o ajuste do modelo para a imipramina, amitriptilina e clomipramina, seus sinais analíticos não aumentaram ao se deslocar para a região ótima na superfície de resposta. Com isso, os valores adotados para a energia de colisão e voltagem do cone para os analitos foram aqueles que geraram maior resposta experimental. Tais valores estão dispostos na **Tabela 15**. A título de curiosidade as superfícies de resposta para cada um dos analitos se encontram na seção A2 do Apêndice.

Tabela 15. Valores de energia de colisão (EC) e voltagem do cone (VC) adotados para os antidepressivos tricíclicos.

Analito	EC	VC
DOX	26	40
IMI	18	40
AMI	26	40
NOR	22	30
CLO	18	40

Em seguida, considerou-se reajustar alguns parâmetros para melhor preservação do equipamento. Ambos os gases de dessolvatação e do contra fluxo do cone são constituídos de N₂ fornecido por um gerador. A fim de preservá-lo diminuiu-se a vazão desses gases, sem grandes alterações nas respostas dos analitos, uma vez que mesmo essas duas variáveis apresentando efeito positivo para a maioria dos analitos, seus efeitos foram pouco ou não significativos. Outra alteração foi na temperatura de dessolvatação que, no histórico do equipamento utilizado, já apresentou problemas necessitando manutenção e substituição da fonte. Embora o efeito dessa variável tenha sido positivo, o aumento do sinal analítico não foi tão expressivo comparando as regiões em torno da região ótima (**Figura 14 a Figura 18**), e por isso optou-se por utilizar uma temperatura de dessolvatação mais baixa para melhor preservação do espectrômetro de massas. Após essas mudanças um novo planejamento PD2 foi realizado, porém, novamente o modelo apresentou falta de ajuste (dados não mostrados). Dessa forma, manteve-se os valores de energia de colisão e voltagem do cone mostrados na **Tabela 15**.

Finalmente os valores adotados para os parâmetros comuns a todos os analitos estão dispostos na **Tabela 16**.

Tabela 16. Valores adotados para os parâmetros de análise no espectrômetro de massas.

Variável	Valor adotado
Temperatura da fonte (°C)	150
Voltagem do capilar (kV)	2
Temperatura de dessolvatação (°C)	480
Vazão do gás de dessolvatação (L h ⁻¹)	720
Vazão do cone (L h ⁻¹)	20
<i>High mass resolution 1</i>	4
<i>Low mass resolution 1</i>	4
<i>Ion energy 1</i>	0,1
<i>High mass resolution 2</i>	4
<i>Low mass 2 resolution 2</i>	4
<i>Ion energy 2</i>	0,6

4.3 Prova de conceito para a eletroextração

A extração do corante catiônico violeta genciana (VG) foi realizada como prova de conceito para melhor visualização da transferência de um analito carregado da fase doadora para o papel cromatográfico. Ao dar início à aplicação de potencial elétrico, já nos primeiros segundos de extração foi possível notar o aparecimento da coloração violeta na ponta do papel cromatográfico, através do qual o corante foi migrando e se distribuindo ao passar do tempo. Dessa forma, pôde-se comprovar o funcionamento do sistema para extração de substâncias catiônicas, como é o caso dos TCAs, usando papel cromatográfico como suporte para o eletrólito da fase aceptora. A **Figura 19** apresenta o resultado visual da fase aceptora após os três minutos de extração.

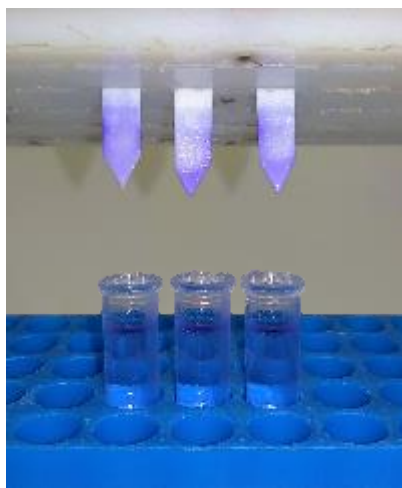


Figura 19. Foto de parte do sistema de eletroextração após a extração de corante violeta genciana. Condições: diferença de potencial elétrico de 300 V durante 3 min; fase doadora composta por 1 mL de VG (2 mg L^{-1}) em tampão McIlvaine pH 3; acetonitrila 1:1 (v/v); filtro orgânico composto por 750 μL de 1-octanol; fase aceptora constituída de papel cromatográfico 3MM Chr embebido com 70 μL de ácido acético 400 mmol L^{-1} ($n = 3$).

4.4 Avaliação do solvente de dessorção

O processo de dessorção após a eletroextração é necessário para que os analitos extraídos no papel cromatográfico possam ser transferidos para o UPLC-MS/MS. Dessa forma, dez misturas de solventes foram testadas a fim de recuperar eficientemente os analitos sorvidos no papel. A **Figura 20** mostra os gráficos que relacionam o percentual de extração dos analitos com a mistura utilizada na dessorção:

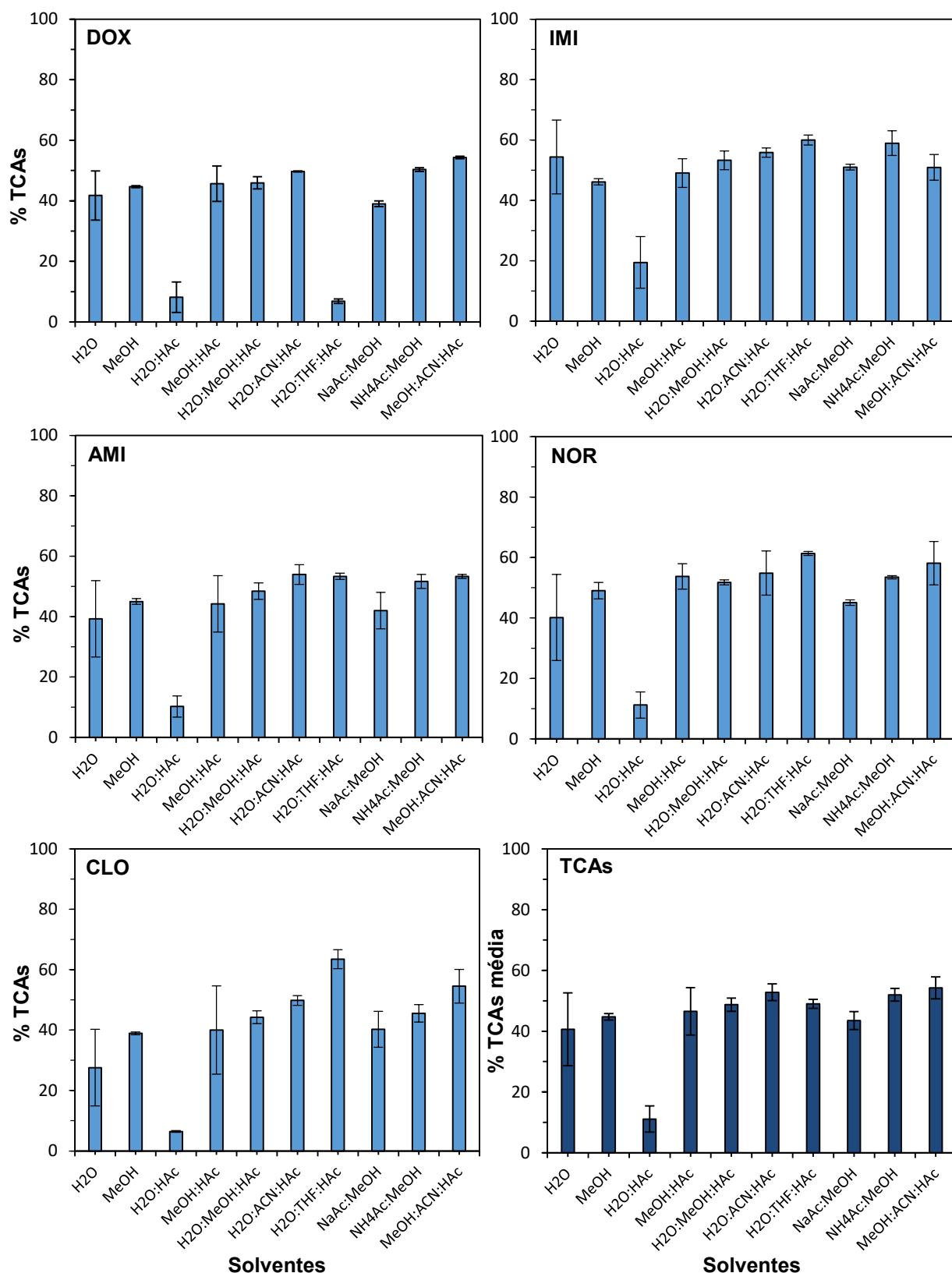


Figura 20. Percentual de extração de TCAs frente às misturas de solventes de dessorção. Solventes: MeOH = metanol, HAc = ácido acético, ACN = acetonitrila, THF = tetrahydrofurano, NaAc = acetato de sódio, NH₄Ac = acetato de amônio. Volume de solvente: 0,55 mL. Tempo de dessorção: 30 segundos (vórtex, 2000 rpm), 5 min (ultrassom) (n = 3).

Nesse experimento a fase doadora, após a eletroextração, também foi analisada para certificar-se que os resultados obtidos na dessorção fossem de fato um reflexo dos diferentes solventes testados e não de algum possível problema na eletroextração.

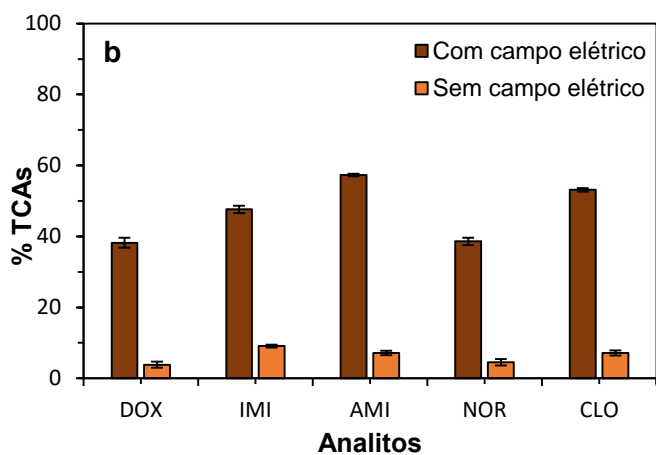
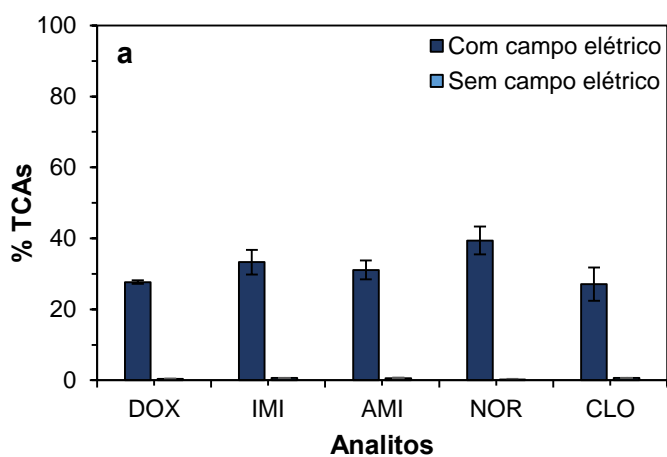
O papel cromatográfico usado como fase aceptora é constituído de celulose que possui diversos grupos hidroxila e também grupos acetais capazes de interagir com os analitos catiônicos por meio de ligações de hidrogênio e até mesmo interações iônicas. Além disso outros materiais como silicatos e carbonatos muitas vezes também são adicionados ao papel para sua manufatura e não se pode esquecer que depois de mergulhado no filtro orgânico um resíduo desse filtro (1-octanol no caso) ficará sobre o papel deixando uma camada de interações hidrofóbicas. O solvente de dessorção deve ser então capaz de quebrar essas diferentes possíveis interações com os analitos, que podem ocorrer por meio de mecanismos semelhantes às encontradas em cromatografia de partição, adsorção e troca iônica. Sendo assim escolheu-se avaliar os principais solventes empregados em cromatografia (MeOH, ACN e THF) com propriedades de acidez, basicidade e interações pi distintas no triangulo de seletividade de solventes do Snyder associados ou não com componentes que alterem o equilíbrio hidrogeniônico do meio (HAc e NH₄Ac). Um resultado marcante observado foi que a utilização de algum solvente orgânico é fundamental para se ter reprodutibilidade e eficiência na dessorção. Algumas misturas testadas tiveram um desempenho parecido, sendo assim, escolheu-se a mistura contendo MeOH: ACN: HAc para seguir com os demais experimentos, visto que ela apresentou os maiores percentuais de dessorção para a maioria dos analitos e é uma mistura que contempla a quebra de interações hidrofóbicas, por ligação de hidrogênio e cargas simultaneamente. A mistura contendo THF também seria uma opção interessante, contudo ela resultou em uma baixa recuperação para a doxepina e também ocasionou uma distorção dos picos cromatográficos devido a maior força eluotrópica desse solvente para a cromatografia de fase reversa empregada.

4.5 Estudo univariado das condições que afetam a eletroextração

Para avaliar os fatores que poderiam afetar a eletroextração, estudos univariados foram conduzidos com posterior análise por UHPLC-MS/MS que é uma técnica analítica robusta capaz de fornecer informações precisas frente aos estudos do sistema de eletroextração.

4.5.1 Efeito do campo elétrico: teste inicial

O campo elétrico é um fator crucial para a extração eficiente dos analitos. A **Figura 21** mostra o percentual de TCAs em cada uma das fases do sistema de eletroextração após o processo de extração onde as barras nas cores azul, laranja e verde do gráfico correspondem, respectivamente, à fase aceptora (dessorção), ao filtro orgânico e à fase doadora.



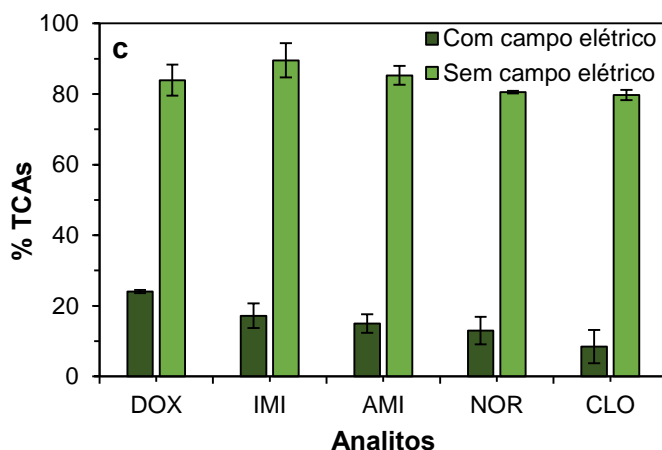


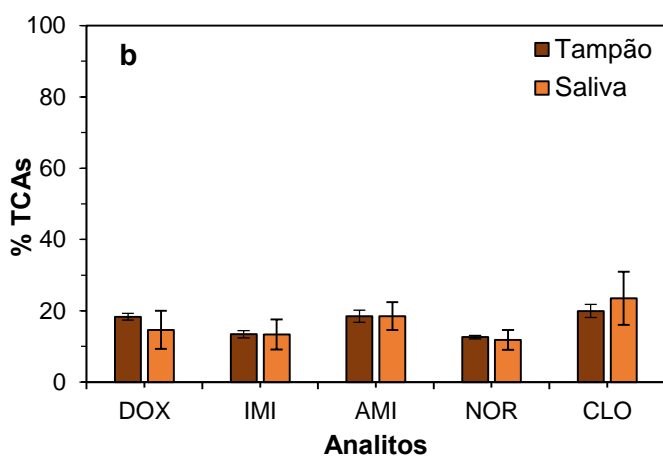
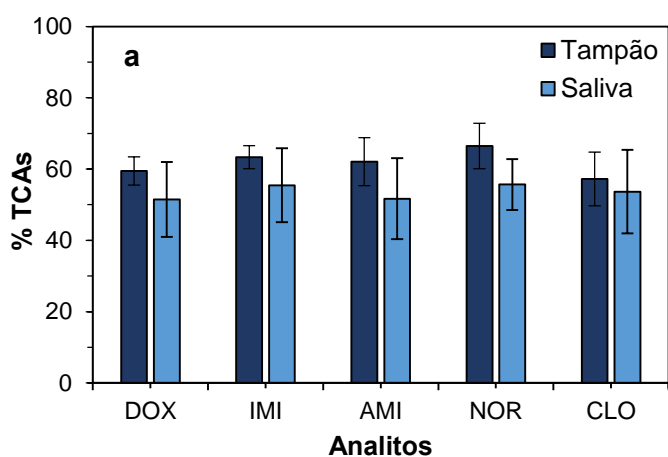
Figura 21. Influência do campo elétrico na distribuição dos TCAs nas fases (a) aceptora, (b) filtro orgânico e (c) fase doadora do sistema. Condições: diferença de potencial de 300 V durante 10 min; fase doadora composta de 1 mL de TCAs $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ em $\text{NH}_4\text{Ac } 50 \text{ mmol L}^{-1}$; ACN 1:1 (v/v); filtro orgânico formado por $750 \mu\text{L}$ de 1-octanol; fase aceptora representada por papel cromatográfico 1 Chr embebido com $70 \mu\text{L}$ de HAc 400 mmol L^{-1} ($n = 3$).

Observa-se claramente nestes resultados que a extração dos analitos para o filtro se dá majoritariamente pela aplicação da diferença de potencial elétrico entre as fases doadora e aceptora e que a difusão passiva dos analitos da fase doadora para o filtro orgânico e então para a fase aceptora ocorre, como era esperado, mas tem uma contribuição pequena. Os analitos em sua forma neutra têm afinidade pela fase orgânica devido ao caráter hidrofóbico que possuem ($\log p > 4$), mas como estão protonados na fase doadora, se particionam pouco para o filtro, nessa condição. Esse fato é contornado pela aplicação do campo elétrico que atua sobre os analitos básicos, resultando em sua migração da fase doadora (polo positivo) para a fase aceptora (polo negativo).

4.5.2 Comparação entre solução tampão e saliva artificial como fases doadoras

Para avaliar uma possível interferência da matriz no processo de eletroextração que invalidasse as otimizações iniciais em solução tampão, comparou-se a performance de extração dos TCAs usando ora uma solução de $\text{NH}_4\text{Ac } 50 \text{ mmol L}^{-1}$, ora a saliva artificial, ambas fortificadas com TCAs $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Foi observado que ao adicionar a acetonitrila à saliva houve segregação da α -amilase. Para contornar esse fato e continuar a usar a mesma quantidade de acetonitrila, a fase doadora foi agitada no vórtex até a completa reintegração da α -amilase na solução antes da eletroextração.

Observando os gráficos da **Figura 22**, nota-se que o percentual de extração dos TCAs na saliva artificial e no tampão foram similares e segundo os testes F e t esses resultados não diferiram estatisticamente ao nível de confiança de 95%. Diante disso os demais estudos foram feitos usando tampão na fase doadora para facilitar a execução dos experimentos e manter melhor controlada a composição do sistema, possibilitando a injeção da fase doadora já que a injeção da saliva artificial não é recomendada devido ao seu alto teor de carboximetilcelulose que poderia entupir a coluna analítica empregada.



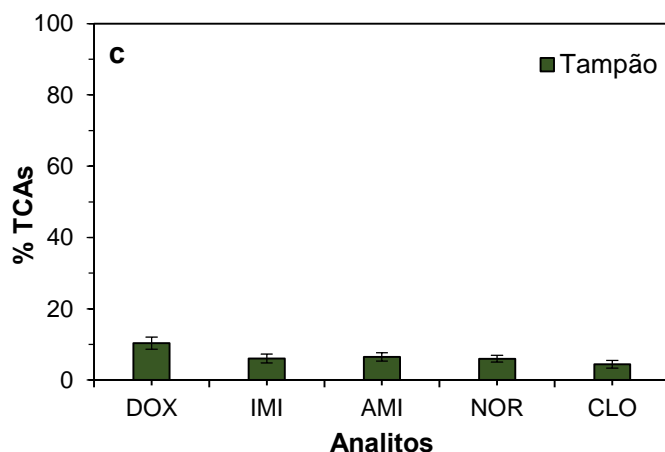
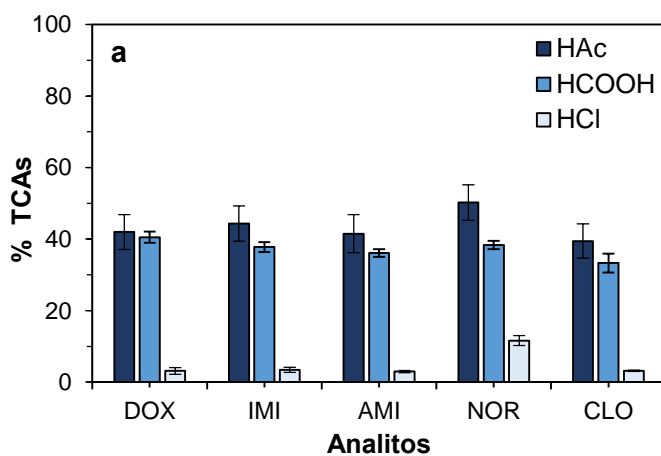


Figura 22. Comparação entre o tampão NH_4Ac 50 mmol L^{-1} e a saliva artificial empregados na fase doadora na distribuição de TCAs nas fases (a) aceptora, (b) filtro orgânico e (c) fase doadora do sistema. Condições: diferença 300 V, tempo: 10 min, fase doadora: 1 mL de TCAs $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ em NH_4Ac 50 mmol L^{-1} (ou saliva artificial): ACN 1:1 v/v, filtro: 750 μL de 1-octanol, fase aceptora: papel cromatográfico 3MM Chr embebido com 70 μL de HAc 400 mmol L^{-1} ($n = 3$).

4.5.3 Efeito do eletrólito da fase aceptora

O eletrólito da fase aceptora desempenha um papel importante na eletroextração, pois por ser a fase final deve conter um pH adequado para que os analitos que atravessaram o filtro e atingiram essa fase, nela permaneçam. Além disso o esgotamento dos íons presentes nessa fase delimita o término da extração. Os eletrólitos HCl 10 mmol L^{-1} (pH 2,01), HCOOH 400 mmol L^{-1} (pH 2,01) e HAc 400 mmol L^{-1} (pH 2,50) foram testados e o resultado do percentual de extração de TCAs nas três fases se encontra na **Figura 23**.



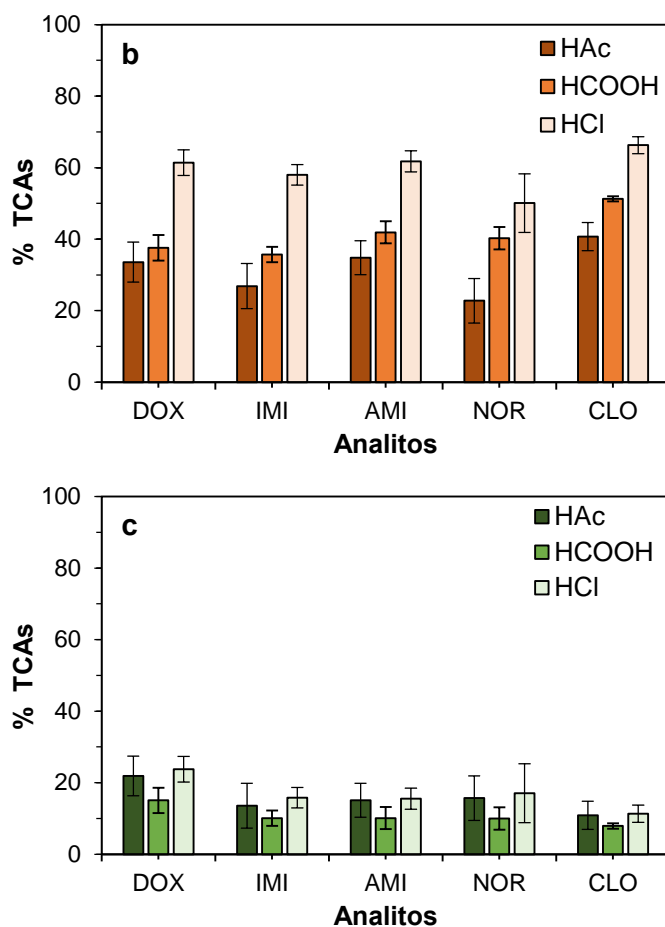


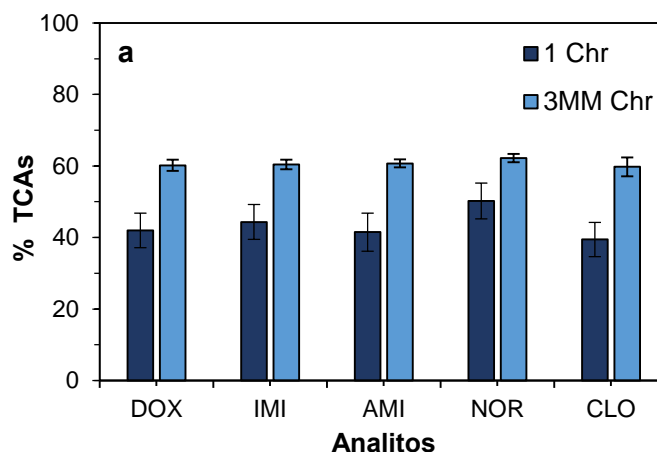
Figura 23. Efeito do eletrólito da fase aceptora na distribuição dos TCAs nas fases (a) aceptora, (b) filtro orgânico e (c) fase doadora do sistema. Condições: diferença de potencial elétrico de 300 V durante 10 min; fase doadora composta de 1 mL de TCAs $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ em $\text{NH}_4\text{Ac } 50 \text{ mmol L}^{-1}$: ACN 1:1 (v/v); filtro orgânico formado de $750 \mu\text{L}$ de 1-octanol; fase aceptora constituída de papel cromatográfico 1 Chr embebido com $70 \mu\text{L}$ de HAc 400 mmol L^{-1} ou HCOOH 400 mmol L^{-1} ou HCl 10 mmol L^{-1} ($n = 3$).

O melhor desempenho de extração foi conseguido utilizando o HAc como eletrólito da fase aceptora. Embora Huang *et al.* (2014)²⁵ tenham visto que na eletroextração de analitos básicos empregando membrana plana, entre eles a amitriptilina, o HAc levou a um percentual de extração menor quando comparado com o HCl e o HCOOH, aqui se viu o contrário. Ao utilizar o ácido clorídrico os analitos ficaram ainda mais concentrados no filtro e foram pouco extraídos para a fase aceptora. Uma possível explicação é a formação de um par iônico entre os analitos protonados e o cloreto mais estável que com os demais ânions. Por ser um composto neutro, esse par permanece no filtro orgânico, diminuindo a extração dos analitos. As performances de extração dos TCAs frente aos eletrólitos HAc e HCOOH não diferiram

estatisticamente (testes F e t a 95% de confiança), sendo assim permaneceu-se com o HAC 400 mmol L⁻¹ (pH 2,50) na fase aceptora para os demais experimentos.

4.5.4 Efeito do tipo de papel da fase aceptora

Um limitante do tempo de extração pode ser a quantidade de eletrólito da fase aceptora, uma vez que o esgotamento dos íons dessa fase acarreta o término da extração dos analitos. Esse pode ser um problema maior em sistemas com o eletrólito da fase aceptora suportado, já que a quantidade de eletrólito nela presente está limitada ao tamanho e espessura do papel. Diante disso, testou-se dois tipos de papéis cromatográficos, constituídos de celulose, o 1Chr e o 3MM Chr, com espessuras de 0,18 µm e de 0,34 µm, respectivamente. Em ambos os papéis o volume de eletrólito adicionado foi de 70 µL, mas para o papel 1 Chr, um excesso de eletrólito foi retirado. Como o papel cromatográfico 3MM Chr é mais espesso, ele é capaz de conter uma quantidade maior de eletrólito. Dessa forma há maior quantidade de íons na fase aceptora para trocar com a fase doadora, aumentando a extração dos analitos, como observado nos gráficos que mostram os percentuais de TCAs em cada fase do sistema (Figura 24).



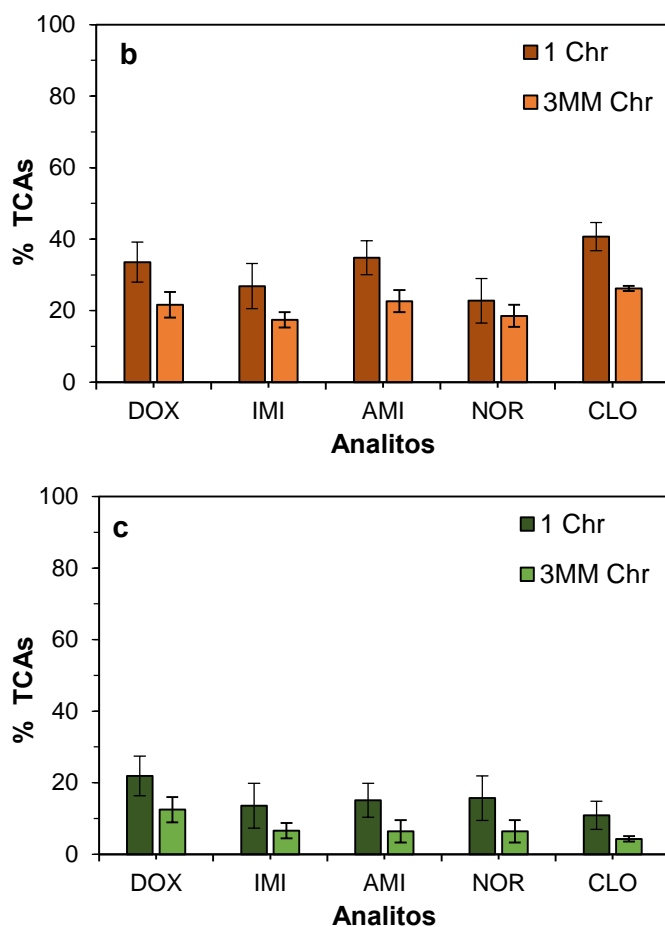


Figura 24. Influência do suporte da fase aceptora na distribuição de TCAs nas fases (a) aceptora, (b) filtro orgânico e (c) fase doadora do sistema. Condições: diferença de potencial elétrico de 300 V e tempo de 10 min; fase doadora composta por 1 mL de TCAs $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ em $\text{NH}_4\text{Ac } 50 \text{ mmol L}^{-1}$: ACN 1:1 (v/v); filtro orgânico constituído de $750 \mu\text{L}$ de 1-octanol; fase aceptora composta por papel cromatográfico 1 Chr ou 3MM Chr embebidos com $70 \mu\text{L}$ de HAc 400 mmol L^{-1} ($n = 3$).

4.5.5 Efeito do solvente orgânico presente na fase doadora

O solvente orgânico presente na fase doadora faz com que a condutividade elétrica do meio diminua, aumentando o campo elétrico nessa fase e, por conseguinte, tornando a extração dos analitos mais eficiente. O uso de solventes miscíveis em água na fase doadora já foi relatado por Raterink *et al.* (2013)²⁹ e Orlando *et al.* (2019)³¹ em trabalhos de eletroextração com o filtro orgânico livre. A fim de testar a performance da eletroextração frente a diferentes solventes, usou-se acetonitrila, metanol e etanol individualmente na fase doadora. A **Figura 25** mostra a quantidade percentual dos TCAs nas fases do sistema após a extração.

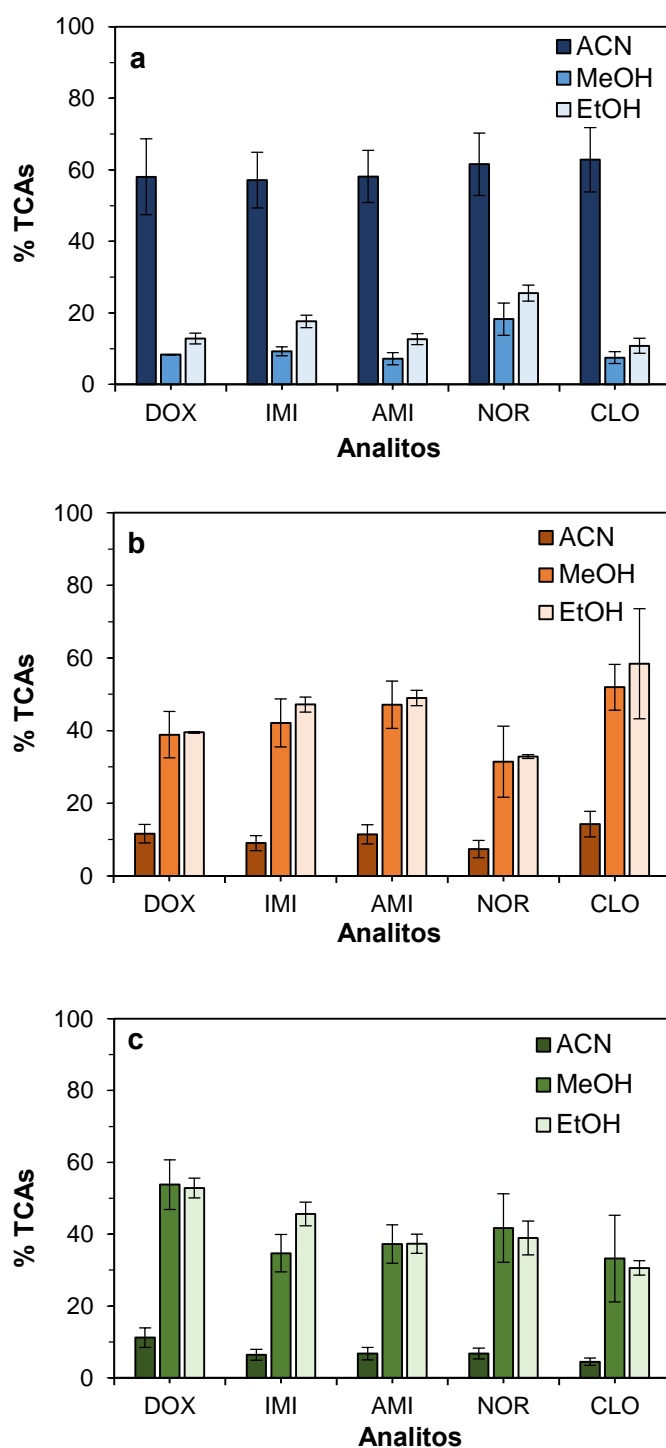
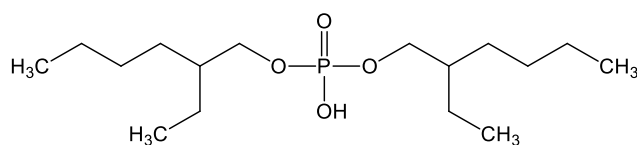


Figura 25. Influência do solvente orgânico presente na fase doadora na distribuição de TCAs nas fases (a) aceptora, (b) filtro orgânico e (c) fase doadora do sistema. Condições: diferença de potencial elétrico 300 V aplicado por 10 min; fase doadora composta por 1 mL de TCAs 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em NH_4Ac 50 mmol L^{-1} ; ACN (ou MeOH, EtOH) 1:1 (v/v); filtro orgânico constituído de 750 μL de 1-octanol; fase aceptora composta por papel cromatográfico 3 MM Chr embebido com 70 μL de HAc 400 mmol L^{-1} . ACN = acetonitrila; MeOH = metanol; EtOH = etanol ($n = 3$).

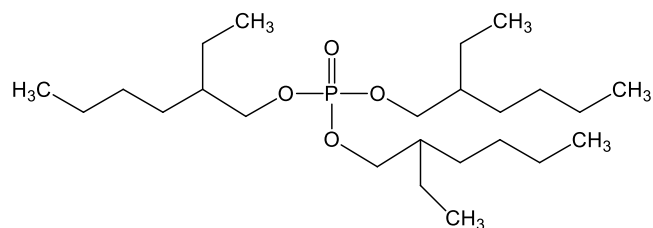
O melhor percentual de extração foi conseguido quando se utilizou acetonitrila na fase doadora e uma possível explicação para esse fato está na maior difusão desse solvente para o filtro orgânico, que não acontece, visivelmente, para os demais solventes testados. Então ao solvatar os analitos protonados a ACN age como uma espécie de carreador facilitando a entrada dos analitos no filtro orgânico e conseqüentemente sua migração para a fase aceptora. Porém em trabalhos de eletroextração em membrana a acetonitrila teve desempenho insatisfatório. Seip *et al.* (2013)⁸⁸ e Rahmani *et al.* (2015)⁸⁹ testaram esses mesmos solventes usando como filtro o 2-etilhexanol e o NPOE, respectivamente e ambos relataram que ao usar acetonitrila tiveram menores recuperações dos analitos e atribuíram esse fato à alta solubilidade do solvente da SLM (filtro orgânico) em acetonitrila, o que afeta a estabilidade da membrana. Eles também observaram, assim como no presente trabalho, que o metanol e o etanol não se difundem significativamente para o filtro orgânico, ao contrário da acetonitrila. Como no presente trabalho a membrana é livre, ou seja, o solvente usado como filtro orgânico não está suportado por uma fibra oca como nos trabalhos citados, a difusão da acetonitrila da fase doadora para o filtro não foi um problema no teor de 50% (v/v) avaliado. Se o percentual de orgânico fosse maior que 50% talvez nesse caso poderia ser formada uma complexa mistura entre a fase doadora e o filtro ocasionando uma extinção da divisão de fases. Então para os demais experimentos continuou-se a usar acetonitrila na fase doadora no teor de 50% (v/v).

4.5.6 Efeito da presença de carreador (curcumina) no filtro orgânico

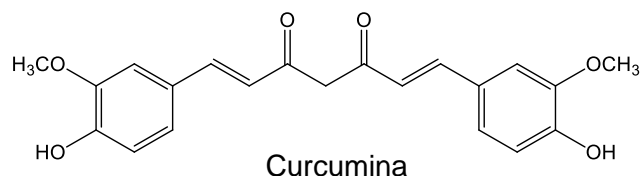
O uso de moléculas carreadoras já foi relatado em alguns trabalhos^{27,70} de eletroextração em membrana na tentativa de melhorar a extração de analitos mais polares. Nesses trabalhos, carreadores como o DEPH e o TEPH (**Figura 26**) foram adicionados à SLM para facilitar a extração dos analitos por meio da formação de pares iônicos mais plenamente solúveis nas SLM's hidrofóbicas como o NPOE. Com base nessa abordagem e no uso da curcumina (**Figura 26**) como complexante para metais,⁹⁰ avaliou-se o seu desempenho como carreador, visto que ela contém grupos aceptores de prótons que poderiam interagir com os TCAs por ligação de hidrogênio, facilitando a migração dos analitos protonados, para o filtro.



Tris (2-etilhexil) fosfato (TEHP)



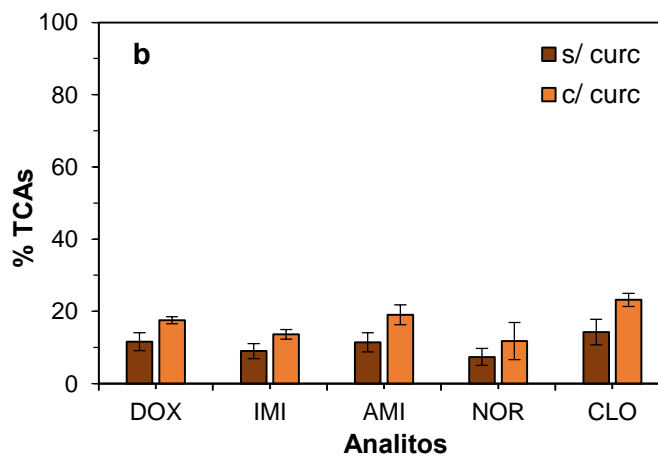
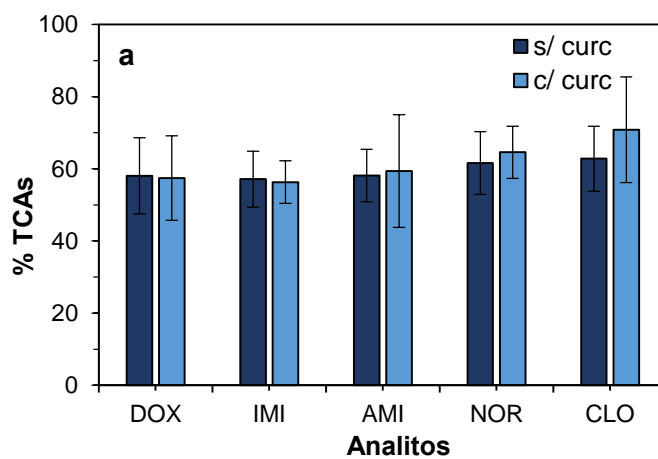
Di (2-etilhexil) fosfato (DEHP)



Curcumina

Figura 26. Estrutura molecular do TEPH, do DEHP e da curcumina

A **Figura 27** mostra o percentual de TCAs nas fases do sistema após a extração na ausência e presença de curcumina no filtro orgânico.



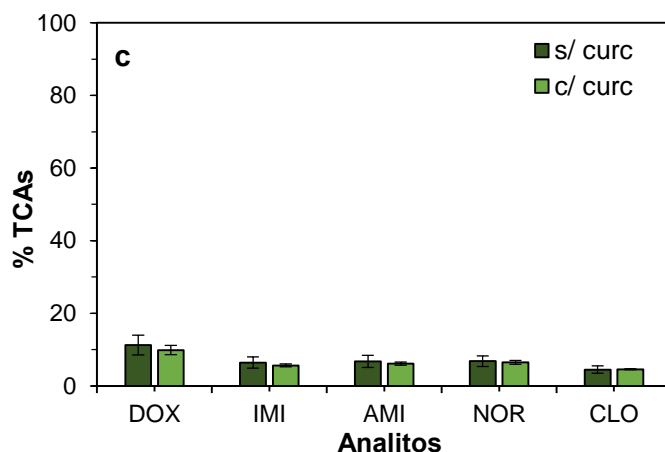


Figura 27. Influência da presença de curcumina no filtro orgânico na distribuição de TCAs nas fases (a) aceptora, (b) filtro orgânico e (c) fase doadora do sistema. Condições: diferença de potencial aplicado 300 V durante 10 min; fase doadora composta por 1 mL de TCAs $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ em $\text{NH}_4\text{Ac } 50 \text{ mmol L}^{-1}$: ACN 1:1 (v/v); filtro orgânico constituído de $750 \mu\text{L}$ de 1-octanol (ou com curcumina $0,1\% \text{ m/v}$); fase aceptora composta por papel cromatográfico 3MM Chr embebido com $70 \mu\text{L}$ de HAC 400 mmol L^{-1} . s/ curc = sem curcumina; c/ curc = com curcumina (n = 3).

Esperava-se que a curcumina pudesse interagir com os analitos catiônicos aumentando sua extração, porém não houve efeito pronunciado na extração dos TCAs (resultados não diferiram estatisticamente ao nível de confiança de 95% – testes F e t) e os analitos ficaram mais retidos na porção filtro quando utilizado esse composto. Dessa forma, prosseguiu-se com os experimentos, como de costume, sem a utilização de curcumina no filtro orgânico.

4.6 Estudo multivariado das condições que afetam a eletroextração

Nessa seção foram descritos dois planejamentos experimentais, um visando a otimização da composição do filtro orgânico e outro para os demais parâmetros de maior importância para a eletroextração que são o tempo de extração, potencial aplicado e percentual de orgânico na fase doadora.

4.6.1 Planejamento de misturas para otimização da composição do filtro orgânico

O filtro orgânico é uma região determinante na eletroextração, uma vez que possui a maior resistência elétrica do sistema e também uma barreira química à passagem do analito pelos processos de difusão e partição. A fim de otimizar a composição do filtro visando uma melhora no percentual de extração fez-se um planejamento de misturas usando o 1-octanol, o 2-etilhexanol e o acetato de etila. A significância da regressão e a falta de ajuste do modelo foram avaliadas por ANOVA (**Tabela 17**). Para todos os analitos a regressão foi significativa com $F_{cal} > F_{tab}$ e não houve falta de ajuste com $F_{cal} < F_{tab}$. Apesar do planejamento realizado ser um simplex, a falta de ajuste pôde ser calculada porque alguns efeitos de segunda ordem não foram significativos e então os parâmetros relacionados a eles puderam ser retirados do modelo gerando graus de liberdade suficiente para obter o valor da falta de ajuste. Na **Tabela 18** estão os coeficientes utilizados nos modelos e as tabelas completas estão no apêndice (seção B).

Tabela 17. Parâmetros da ANOVA para os modelos ajustados na otimização da composição do filtro orgânico para extração de TCAs. Nível de confiança de 95%.

Analito	Significância da regressão		Falta de ajuste		R ²
	F _{cal}	F _{tab} *	F _{cal}	F _{tab} **	
DOX	183,41	4,12	0,07	5,99	0,9905
IMI	168,97	4,12	0,43	5,99	0,9897
AMI	106,65	4,25	2,45	4,75	0,9595
NOR	259,66	4,12	1,68	5,99	0,9933
CLO	152,46	4,46	1,8	5,14	0,9828

*Graus de liberdade da regressão e dos resíduos: 4 e 7 respectivamente, para a dox, imi e nor; 2 e 9 para ami e 3 e 8 para clo; **Graus de liberdade da falta de ajuste e do erro puro: 1 e 6 para dox, imi e nor; 3 e 6 para a ami e 2 e 6 para clo.

Tabela 18. Coeficientes do modelo ajustado para a otimização da composição do filtro orgânico. Nível de confiança de 95%.

Fatores	Coeficientes				
	DOX	IMI	AMI	NOR	CLO
1-octanol (A)	9406,00	30083,50	4620,35	10343,42	12138,90
2-ETH (B)	9231,00	30605,58	5566,15	12818,00	10400,50
Ac Et (C)	57513,00	181301,08	47992,75	41548,92	144055,10
AB	-23634,00	-78824,17	-	-23118,83	-
AC	-28898,00	-72563,17	-	-	-65200,00
BC	-	-	-	12802,17	-

2-ETH: 2-etilhexanol; Ac Et: acetato de etila.

Na **Figura 28** encontra-se o mapa de contorno da função desejabilidade dos analitos para os modelos ajustados.

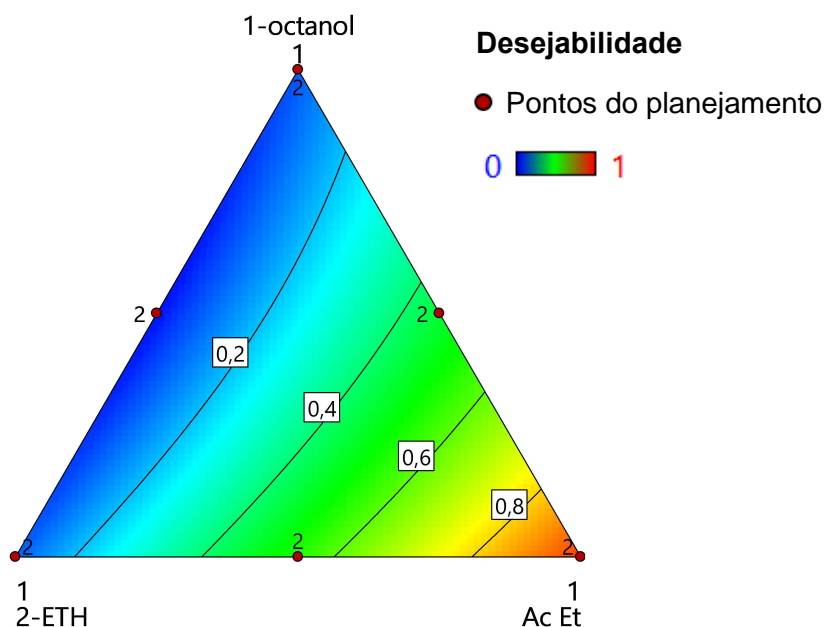


Figura 28. Mapa de contorno da função desejabilidade para otimização da composição do filtro orgânico.

Para todos os analitos o percentual de extração foi maior quando se utilizou apenas o acetato de etila como filtro. Com base no trabalho de Rahmani *et al.* (2015)⁸⁹ esperava-se

que o 2-ETH tivesse uma performance superior ao 1-octanol, esse comportamento também foi encontrado no trabalho de Nojavan *et al.* (2018)⁹¹, contudo no presente trabalho não se observou diferença entre as extrações usando um ou outro. Ambos são álcoois que possuem apenas um grupo aceptor de prótons (oxigênio da hidroxila) em suas estruturas, capaz de interagir por ligação de hidrogênio com os analitos protonados. O acetato de etila, por sua vez, já possui dois grupos aceptores constituídos dos oxigênios da porção éster, o que favorece a interação com os analitos. Outro fator, é que o acetato de etila possui uma condutividade elétrica menor que o octanol ($1,0 \times 10^{-9}$ contra $1,4 \times 10^{-7}$),⁹² fazendo com que o campo elétrico no filtro aumente, favorecendo a eletromigração por essa fase.

Como esse ensaio foi realizado com um percentual de 25% (v/v) de ACN na FD, o percentual de extração dos TCAs utilizando o 1-octanol caiu drasticamente. Então repetiu-se a extração usando 50% de ACN para comparar a performance do 1-octanol e do acetato de etila. O percentual de extração médio de TCAs com o acetato de etila nessa última condição foi 15% maior que o percentual obtido quando se usou o 1-octanol. Visto que não é um ganho tão expressivo, como quando se usou 25% de ACN (aumento médio de 416% na extração ao substituir o octanol por acetato de etila), optou-se por continuar com o 1-octanol, visando uma maior facilidade de manipulação, já que o acetato de etila é potencialmente mais tóxico e volátil.

4.6.2 Efeito da precipitação proteica na recuperação de TCAs

A precipitação de proteínas como preparo de amostras devido à adição de solventes orgânicos polares entre outros compostos precipitantes é bem conhecida. No presente trabalho a precipitação proteica, embora não necessária, foi realizada de forma espontânea pela adição de acetonitrila à saliva, para a composição da fase doadora. A princípio, essa precipitação não representaria necessariamente um problema, porém havia a possibilidade de o precipitado carrear junto consigo parte dos analitos. Buscando evitar tal precipitação, avaliou-se diferentes percentuais de acetonitrila adicionada à saliva real. Esse teste foi realizado com a saliva real, visto que na saliva artificial a segregação da α -amilase era reversível, com a agitação da fase doadora no vórtex, processo que não foi conseguido com a saliva real. Para o percentual de 25% de ACN não houve precipitação, e então esse percentual foi utilizado na otimização do filtro orgânico (seção 4.6.1). Porém, como observado na seção anterior o percentual de extração de TCAs foi reduzido drasticamente usando 25% de ACN passando de uma porcentagem de extração média de 54 para 6%. Sendo assim avaliou-se se a precipitação das proteínas presentes na saliva real, usando 50% de ACN

poderia estar ocasionando perda dos analitos e os resultados dessa avaliação estão apresentados na **Figura 29**.

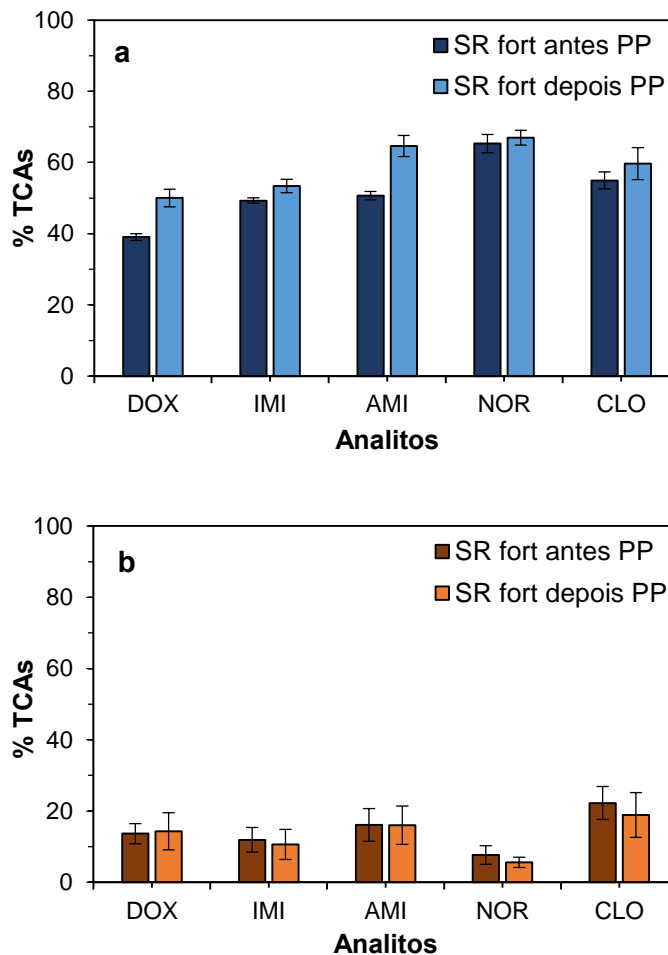


Figura 29. Influência da precipitação de proteína na recuperação de TCAs no sistema de eletroextração avaliada na (a) fase aceptora e (b) no filtro orgânico do sistema. Condições: diferença de potencial de 300 V aplicado durante 10 min; fase doadora composta por 1 mL de TCAs $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ em saliva real: ACN 1:1 (v/v); filtro orgânico constituído de $750 \mu\text{L}$ de 1-octanol; fase aceptora composta por papel cromatográfico 3MM Chr embebido com $70 \mu\text{L}$ de HAc 400 mmol L^{-1} . SR = saliva real; PP = precipitação proteica (n = 3).

Observando esses resultados, é possível perceber que essa perda não é significativa (testes F e t a 95% de confiança) e então continuou-se a usar 50% de acetonitrila na fase doadora para os demais experimentos com exceção do teste já mencionado.

4.6.3 Planejamento Box-Behnken para otimização das condições de eletroextração

O tempo e a diferença de potencial elétrico são fatores de grande influência na eletroextração. A fim de encontrar um compromisso entre essas variáveis e o percentual de orgânico na FD, otimizou-se esses fatores através do planejamento Box-Behnken. A significância da regressão e a falta de ajuste foram avaliadas pela ANOVA, cujos parâmetros estão dispostos na **Tabela 19**.

Houve a necessidade de aplicar uma transformação na resposta (área dos picos cromatográficos) para que o modelo melhor se ajustasse. Dessa forma, a resposta utilizada foi o logaritmo das áreas dos picos de TCAs. Após a transformação os modelos não apresentaram falta de ajuste ($F_{cal} < F_{tab}$) e as regressões foram significativas ($F_{cal} > F_{tab}$).

Tabela 19. Parâmetros da ANOVA do modelo ajustado para a otimização do tempo, diferença de potencial elétrico e porcentagem de solvente orgânico na fase doadora para a extração de TCAs. Nível de confiança de 95%.

Analito	Significância da regressão		Falta de ajuste		R ²
	F _{cal}	F _{tab} *	F _{cal}	F _{tab} **	
DOX	89,88	3,74	2,59	5,96	0,9540
IMI	96,31	3,41	3,83	6,00	0,9569
AMI	135,31	3,41	1,19	6,00	0,9690
NOR	57,28	3,41	4,67	6,00	0,9297
CLO	110,21	3,41	1,57	6,00	0,9622

*Graus de liberdade da regressão e dos resíduos: 2 e 14 respectivamente para a doxepina e 3 e 13 para os demais TCAs; **Graus de liberdade da falta de ajuste e do erro puro: 10 e 4 respectivamente para a doxepina e 9 e 4 para os demais TCAs.

Com exceção da doxepina, para a qual o efeito da voltagem não foi significativo, para todos os analitos os efeitos das variáveis potencial, tempo e percentual de orgânico foram significativos e positivos, com significância crescente nessa ordem. (As tabelas completas estão no apêndice na seção C). Com a transformação na resposta, modelos lineares foram ajustados e os coeficientes utilizados nos modelos estão apresentados na **Tabela 20**.

Tabela 20. Coeficientes do modelo ajustado na otimização das condições de eletroextração. Nível de confiança de 95%.

Fatores	Coeficientes				
	DOX	IMI	AMI	NOR	CLO
Potencial (A)	-	4,35	0,15	0,21	0,16
Tempo (B)	0,36	0,17	0,38	0,45	0,41
% Org FD (C)	1,02	0,42	1,06	1,02	1,09

Na **Figura 30** está o mapa de contorno da função desejabilidade relacionando o tempo e o potencial elétrico, com a variável percentual de orgânico na fase doadora mantida no nível alto de 50% (v/v). Embora as respostas experimentais tenham aumentado com o aumento dos níveis das variáveis, o ganho no percentual de extração ao sair do tempo de 10 minutos, comumente usado, para 18 minutos não foi expressivo ao ponto de se quase dobrar o tempo de extração e, portanto, manteve-se a condição usual com potencial de 300 V, tempo de 10 minutos e percentual de orgânico de 50% v/v.

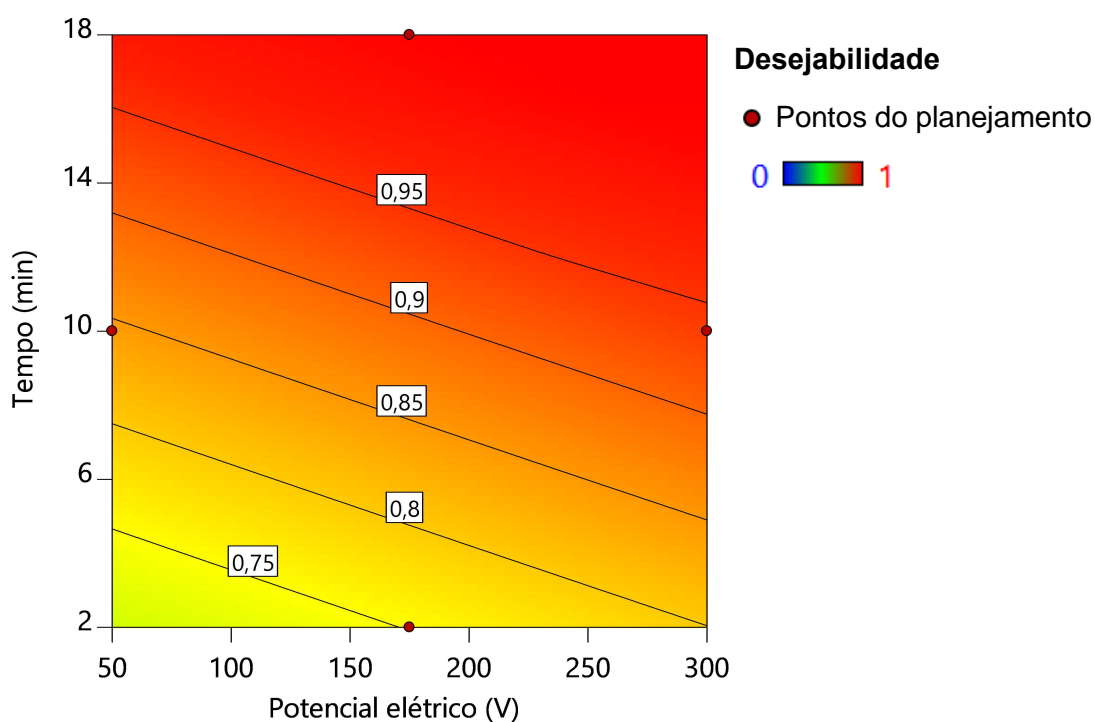


Figura 30. Mapa de contorno da função desejabilidade para otimização da eletroextração relacionando tempo e potencial. A variável percentual de orgânico na fase doadora foi mantida no nível mais alto (50% v/v).

4.7 Validação do método

O método de eletroextração seguido pela análise por UHPLC-MS/MS, intitulado EE-UHPLC-MS/MS foi validado usando saliva artificial, seguindo as diretrizes do guia da Eurachem⁸², mas com algumas modificações pertinentes à realidade laboratorial. Empregou-se as condições otimizadas na eletroextração: 300 V por 10 minutos com 50% v/v de ACN na fase doadora e as condições de análise descritas nas seções 3.4 para a cromatografia e 4.2 para a espectrometria de massas.

4.7.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada observando os cromatogramas do branco de saliva artificial extraído, onde se pôde perceber a ausência de picos cromatográficos nos tempos de retenção dos TCAs. Na **Figura 31** estão os cromatogramas obtidos pela análise por UHPLC-MS/MS, após a extração de uma amostra de saliva contendo 12 ng mL⁻¹ de cada TCAs e da amostra branco.

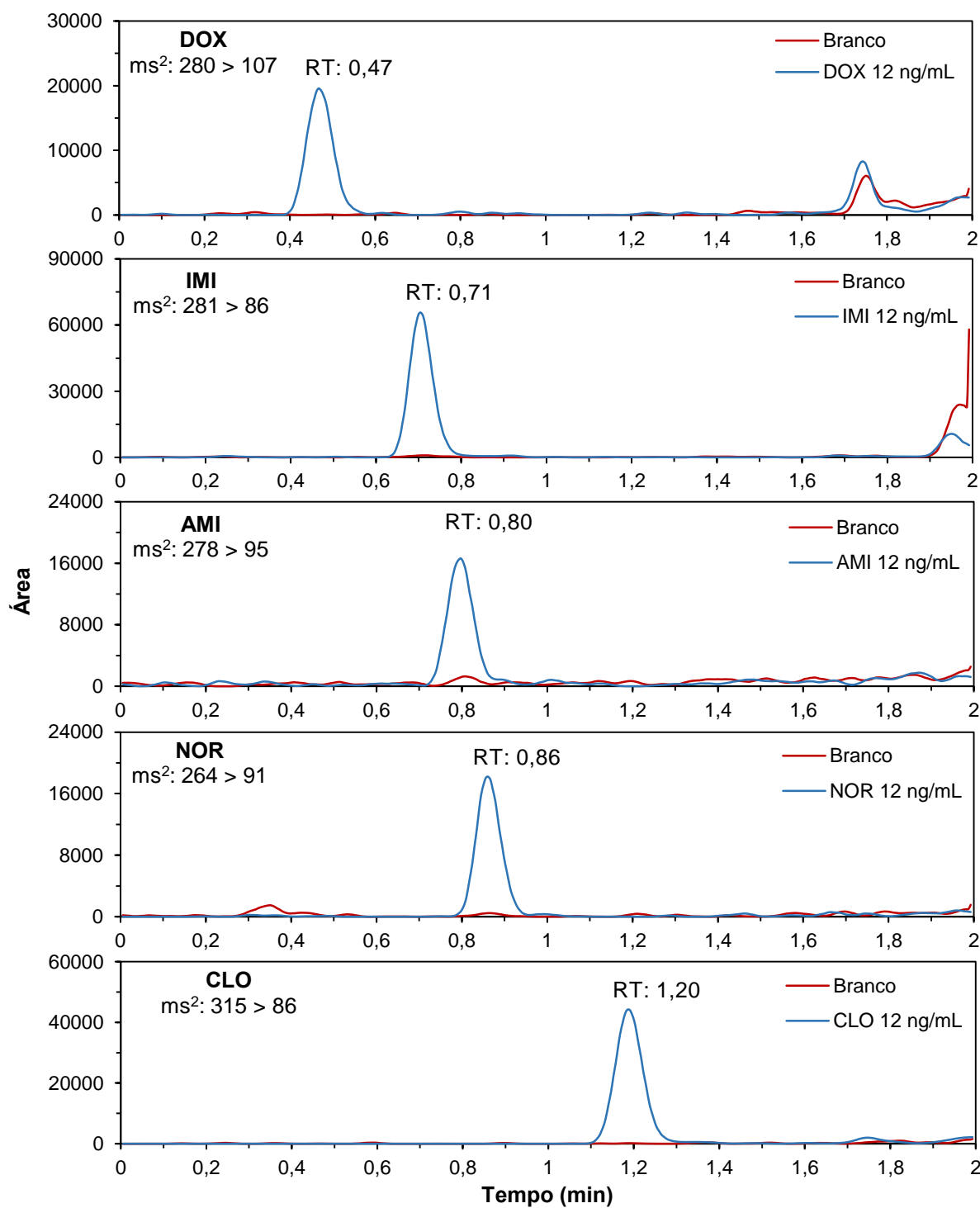


Figura 31. Cromatogramas de TCAs a 12 ng mL⁻¹ e do branco no modo MRM obtidos após a extração e análise no UPLC-MS/MS.

4.7.2 Efeito matriz

Para avaliar se houve efeito matriz, comparou-se as inclinações das curvas preparadas em solvente de dessorção, no extrato de saliva artificial e no extrato de saliva real, duas a duas, através dos testes F e t. As curvas foram construídas através do método dos mínimos quadrados ordinários. Em todos os casos, ainda que visualmente as inclinações das retas não tenham coincidido absolutamente, ambos os dados mostraram-se homocedásticos, com $p > 0,05$ para o teste de homogeneidade de variância e não apresentaram efeito matriz, também com $p > 0,05$ para o teste de igualdade das médias. Da **Figura 32** a **Figura 36** estão dispostas as curvas para os cinco analitos estudados.

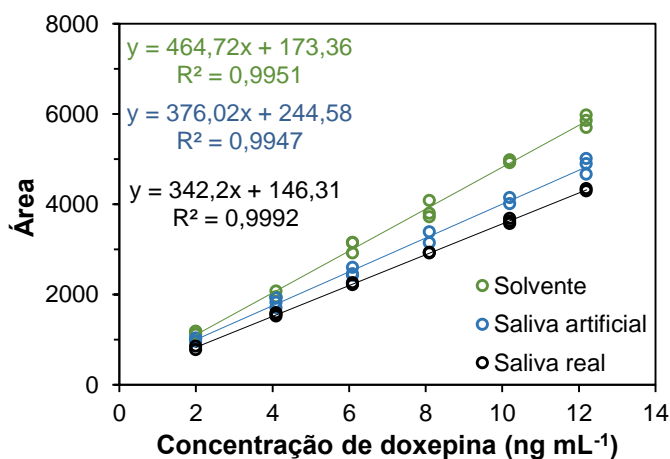


Figura 32. Curvas de doxepina construídas no extrato das matrizes de saliva real e artificial e em solvente (MeOH: ACN: HAc 47,5: 47,5: 5 v/v/v) ($n = 3$).

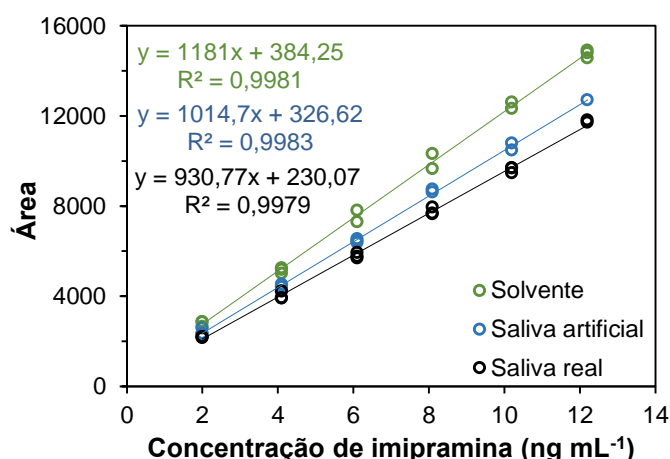


Figura 33. Curvas de imipramina construídas no extrato das matrizes de saliva real e artificial e em solvente (MeOH: ACN: HAc 47,5: 47,5: 5 v/v/v) ($n = 3$).

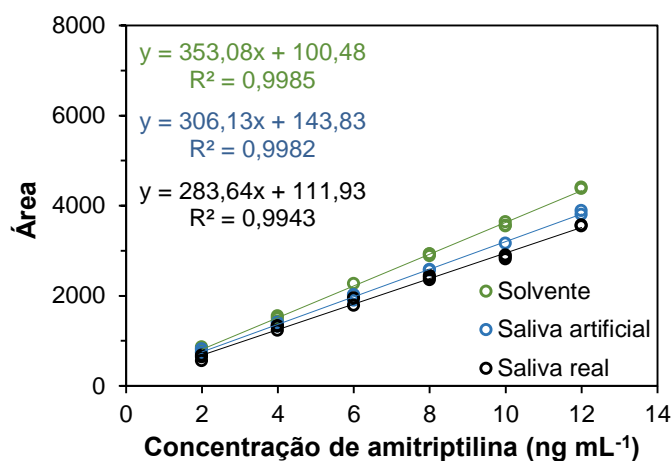


Figura 34. Curvas de amitriptilina construídas em extrato das matrizes de saliva real e artificial e em solvente (MeOH: ACN: HAc 47,5: 47,5: 5 v/v/v) (n = 3).

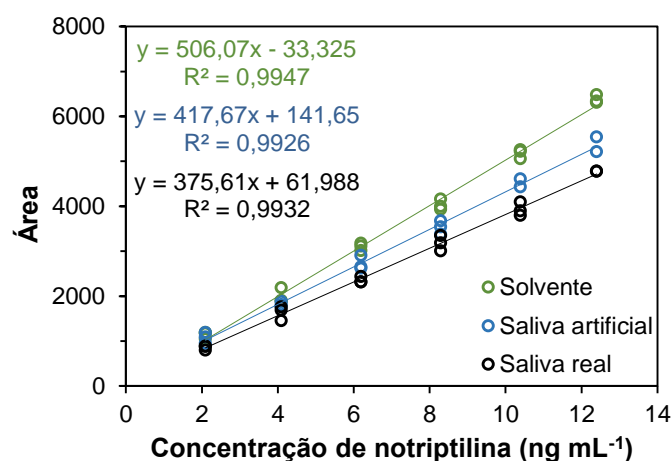


Figura 35. Curvas de nortriptilina construídas em extrato das matrizes de saliva real e artificial e em solvente (MeOH: ACN: HAc 47,5: 47,5: 5 v/v/v) (n = 3).

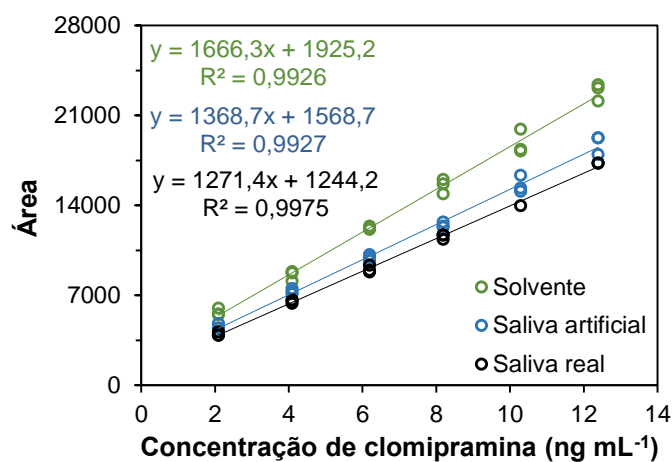


Figura 36. Curvas de clomipramina construídas em extrato das matrizes de saliva real e artificial e em solvente (MeOH: ACN: HAc 47,5: 47,5: 5 v/v/v) (n = 3).

Apesar de não haver efeito matriz, para melhor compatibilidade da curva com as amostras, optou-se por continuar a validação com a saliva artificial, uma vez que as curvas de TCAs obtidas nessa matriz ficaram mais similares às aquelas construídas em saliva real.

4.7.3 Linearidade

Os dados do ensaio de linearidade passaram pelo teste de resíduos de Jackknife e os possíveis *outliers* foram removidos. Através dos testes de Ryan-Joiner, Brown-Forsythe e Durbin-Watson, foi verificado que os resíduos seguiram uma distribuição normal, apresentaram-se homocedásticos, e ausentes de autocorrelação, respectivamente. As curvas analíticas mostraram-se lineares na faixa estudada de 2 a 12 ng mL⁻¹, cujas equações e coeficientes de determinação correspondentes estão apresentados na **Tabela 21**.

Tabela 21. Equações da reta e coeficientes de determinação para a curva extraída de TCAs (n = 3).

Analito	Equação da reta	R ²
Doxepina	108,23 x + 85,40	0,9953
Imipramina	341,64 x – 30,33	0,9962
Amitriptilina	107,08 x + 7,69	0,9972
Nortriptilina	94,60 x + 25,19	0,9928
Clomipramina	255,74 x + 107,64	0,9981

4.7.4 Limites de detecção e quantificação

Uma vez que as amostras branco não apresentam sinal no espectrômetro de massas, a recomendação do guia da Eurachem, que foi seguida, é fortificar o branco com uma concentração muito baixa do analito de modo que ele possa ser detectado. Sendo assim o branco extraído foi fortificado com TCAs na concentração de 0,5 ng mL⁻¹. Os sinais obtidos foram transformados em concentração através das curvas e os limites de detecção e quantificação foram calculados. Seus valores estão dispostos na **Tabela 22**.

Tabela 22. Limites de detecção e quantificação de TCAs para o método EE-UHPLC-MS/MS (n = 10).

Analito	LD (ng mL ⁻¹)	LQ (ng mL ⁻¹)
Doxepina	0,25	0,84
Imipramina	0,13	0,44
Amitriptilina	0,21	0,72
Nortriptilina	0,17	0,57
Clomipramina	0,13	0,44

Os valores de LQ encontrados foram menores que de outros trabalhos de determinação de TCAs em fluido oral usando LC-MS/MS com detector do tipo triplo quadrupolo empregado. Castro *et al.* (2008)⁹³ encontraram LQ de 2 ng mL⁻¹ para a amitriptilina, imipramina e nortriptilina e de 10 ng mL⁻¹ para a clomipramina numa faixa linear do LQ a 500 ng mL⁻¹. E Coulter *et al.* (2010)⁹⁴ encontraram LQ de 5 ng mL⁻¹ para os cinco TCAs numa faixa de 5 a 500 ng mL⁻¹.

4.7.5 Precisão intra e interdias

A precisão do método foi apresentada através do cálculo do coeficiente de variação (CV) de uma sextuplicata de extração em três níveis de fortificação ao longo da curva analítica. Para estimar a precisão interdias o mesmo procedimento de extração foi repetido no dia consecutivo. Os valores obtidos estão resumidos na **Tabela 23**.

Tabela 23. Valores de precisão intra e interdias para a determinação de TCAs, em três níveis de concentração, por EE-UHPLC-MS/MS (n = 6).

Analito	Precisão (%)					
	2 ng mL ⁻¹		6 ng mL ⁻¹		10 ng mL ⁻¹	
	intradia	interdias	intradia	interdias	intradia	interdias
Doxepina	12	25	10	11	9	7
Imipramina	5	8	9	10	8	7
Amitriptilina	13	26	5	13	4	11
Nortriptilina	20	18	5	9	11	8
Clomipramina	5	14	7	10	13	12

Para alguns guias de validação é estipulado que o CV deve ser menor que 15%, a não ser que a concentração estimada seja perto do LQ, então esse valor passa a ser 20%.⁹⁵ Apenas para a doxepina e amitriptilina na precisão interdias os valores de CV ficaram acima de 20%, que podem ser provenientes de erros pontuais na medida. No guia da AOAC Internacional⁹⁶ por sua vez, os limites de aceitabilidade do CV são dados conforme a concentração estimada, sendo de 30% para concentrações na faixa de 1 ppb e de 21% para 10 ppb, o que torna os valores acima de 20% aceitáveis.

4.7.6 Recuperação

A recuperação dos analitos foi estimada através dos mesmos ensaios realizados para a precisão. Os valores encontrados são mostrados na **Tabela 24**.

Tabela 24. Valores de recuperação de TCAs em três níveis de concentração, pelo método EE-UHPLC-MS/MS (n = 6).

Analito	Recuperação (%) (CV)		
	2 ng mL ⁻¹	6 ng mL ⁻¹	10 ng mL ⁻¹
Doxepina	80 (12)	96 (10)	104 (9)
Imipramina	81(5)	107 (9)	108 (8)
Amitriptilina	104 (13)	103 (5)	108 (4)
Nortriptilina	75 (20)	90 (5)	100 (11)
Clomipramina	77 (5)	99 (7)	111 (13)

Os valores encontrados para a recuperação de TCAs mostraram-se satisfatórios segundo os limites estabelecidos pela AOAC Internacional⁹⁶ que apresenta valores de recuperação de 40 a 120 para a concentração de 1 ppb e de 80 a 115 para a concentração de 10 ppb.

4.7.7 Eficiência de extração

Para cada nível de concentração, usou-se os valores de área dos analitos para cada replicata de amostra extraída e dividiu-se pela área média das amostras fortificadas após a extração. Os resultados percentuais estão dispostos na **Figura 37**, onde se pode observar uma pequena diferença nos percentuais de eficiência de extração entre os níveis diferentes de concentração e entre os analitos, contudo esses resultados não diferiram estatisticamente ao nível de confiança de 95% (testes F e t).

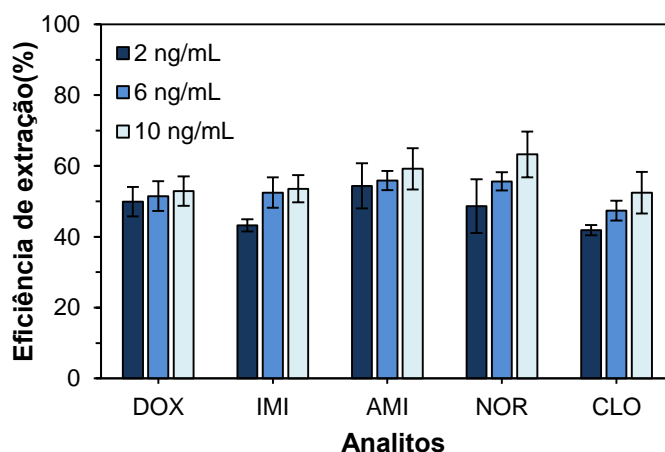


Figura 37. Eficiência de extração para amostras de saliva artificial fortificadas com TCAs nas concentrações de 2, 6 e 10 ng mL⁻¹. Condições: diferença de potencial de 300 V durante 10 min, fase doadora composta por 1 mL de TCAs 6 ng mL⁻¹ em saliva artificial e ACN 1:1 (v/v); filtro orgânico formado por 750 µL de 1-octanol; fase aceptora constituída de papel cromatográfico 3MM Chr embebido com 70 µL de HAc 400 mmol L⁻¹ (n = 6).

O percentual médio de extração ficou em torno de 55%. Percentuais maiores de extração de TCAs por EME já foram relatados,^{23,25} contudo na grande maioria dos trabalhos o filtro orgânico é constituído por NPOE, que apesar de ter uma ótima performance em extrações de analitos básicos não polares é um reagente oneroso.

4.7.8 Comparação entre amostras de saliva de diferentes voluntários

É conhecido que a composição da saliva pode variar consideravelmente de indivíduo para indivíduo⁹⁷ e isso, por conseguinte poderia alterar os resultados analíticos. A robustez do método frente às variações das amostras de saliva foi avaliada, comparando-se o sinal analítico de TCAs para dez diferentes amostras de saliva real fortificadas. A **Figura 38** mostra o gráfico dos sinais analíticos obtidos para os TCAs em função das amostras de saliva. As variações entre o maior e o menor valor encontrados para cada um dos analitos foram de 9, 26, 8, 5 e 25% para a doxepina, imipramina, amitriptilina, nortriptilina e clomipramina, respectivamente.

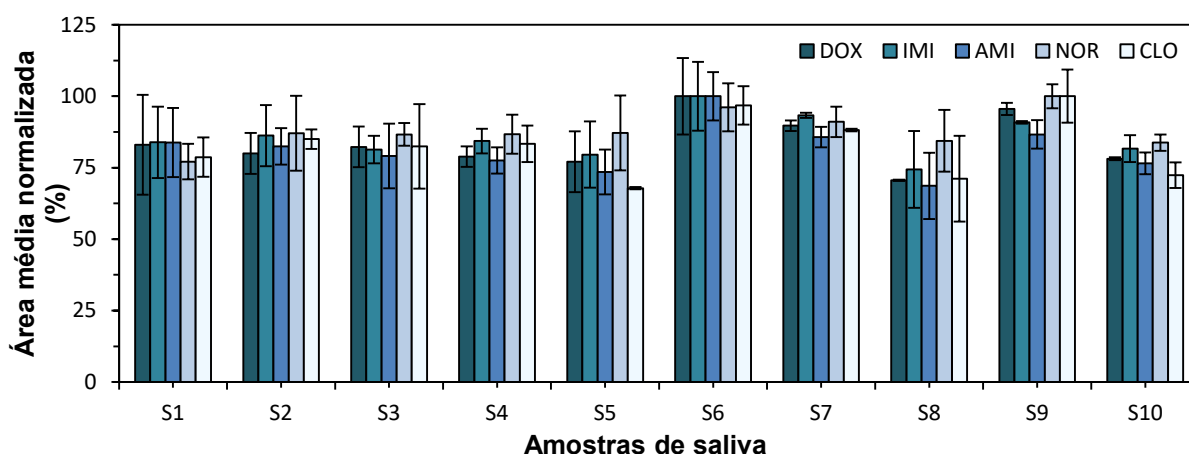


Figura 38. Sinal analítico normalizado de TCAs extraídos de 10 amostras diferentes de saliva real. Condições: diferença de potencial elétrico de 300 V durante 10 min; fase doadora composta por 1 mL de TCAs 6 ng mL⁻¹ em saliva real e ACN 1:1 (v/v); filtro orgânico constituído de 750 µL de 1-octanol; fase aceptora representada por papel cromatográfico 3MM Chr embebido com 70 µL de HAc 400 mmol L⁻¹ (n = 3).

A variação foi pequena entre uma amostra e outra e é compatível com aquela esperada para o método, estimada no ensaio de precisão, de modo que os resultados da análise não foram afetados consideravelmente frente às diferentes amostras. Isso demonstra um *clean-up* adequado das amostras obtido através do procedimento de eletroextração.

4.8 Utilização da técnica PS-MS como triagem para análise de TCAs em fluido oral

O objetivo final do trabalho foi avaliar a aplicação de um método de triagem empregando eletroextração em um sistema que pudesse ser analisado diretamente pela técnica PS-MS. Contudo, primeiramente era necessário provar que o uso do papel cromatográfico em um formato apropriado tanto para eletroextração como para o *paper spray* gerariam recuperações adequadas e reproduzíveis e essas questões foram respondidas com o uso da UHPLC-MS/MS que é uma técnica analítica robusta e já bem estabelecida capaz de dar essas respostas.

Com o papel devidamente desenvolvido para a eletroextração a segunda etapa do trabalho se voltou para verificar se após a extração esse papel na forma suportada poderia ser adequadamente empregado na técnica de *paper spray*. É válido ressaltar que a eletroextração usada na primeira etapa do trabalho poderia ser acoplada diretamente com a PS-MS. Porém o uso da fase aceptora suportada, foi testada visando uma menor variação no

posicionamento da fase aceptora no *plate* de eletroextração e também no momento da ionização por *paper spray*. Esse acoplamento da eletroextração com a PS-MS seja com o papel livre ou suportado foi reivindicado em pedido de patente depositado em 2019 (BR1020190259477).⁹⁸

Como prova de conceito realizou-se uma triplicata de extração do corante violeta genciana para demonstrar o funcionamento do sistema de eletroextração com a fase aceptora suportada. A **Figura 39** mostra a fase aceptora após os 3 minutos de extração. Aqui também houve a migração do corante para a fase aceptora (papel cromatográfico embebido em HAC 400 mmol L⁻¹) comprovando o funcionamento do sistema com essa nova configuração da fase aceptora.



Figura 39. Foto da fase aceptora suportada após a extração do corante violeta genciana.

Então foram realizadas as extrações de TCAs. As análises por UHPLC-MS/MS foram realizadas para que o percentual de extração de TCAs fosse estimado. Esse valor foi cerca de 35%, mais baixo que aqueles conseguidos na eletroextração com a configuração do papel livre. Isso provavelmente se deve à menor área de influência do campo elétrico, já que a maior parte do papel está dentro do suporte tubular.

Para a análise por PS-MS, o uso de um padrão interno foi indispensável, visto que a fonte de ionização por *paper spray* utilizada é manual e por isso está sujeita a muitas variações, que acarretariam resultados irreprodutíveis. A ciclobenzaprina (CBZ) é um relaxante muscular de ação central e foi escolhida como padrão interno por ter uma estrutura muito similar aos antidepressivos tricíclicos. Sua estrutura encontra-se na **Figura 40**.

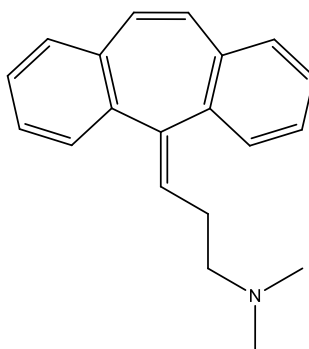


Figura 40. Estrutura molecular da ciclobenzaprina.

Na **Figura 41** está o resultado da análise de TCAs por PS-MS após a eletroextração. Com o uso do padrão interno, conseguiu-se sinais reprodutíveis com coeficientes de variação abaixo de 15% para a maioria dos analitos, apenas para a nortriptilina esse valor foi de 19%. E a pré-concentração obtida foi de no mínimo 3,5 vezes considerando um percentual de extração de 35%. Esses resultados iniciais demonstram a funcionalidade do acoplamento da eletroextração com a PS-MS e a possibilidade do uso da técnica em análises exploratórias.

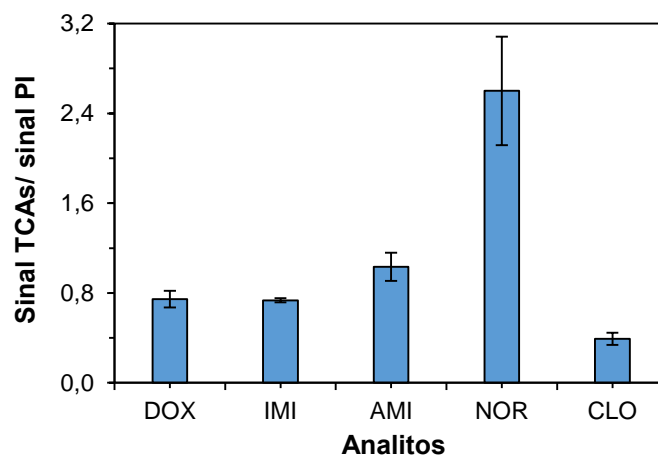


Figura 41. Razão do sinal de TCAs e do padrão interno (ciclobenzaprina) na análise por PS-MS. Condições: diferença de potencial de 300 V durante 10 min, fase doadora composta por 1 mL de TCAs e CBZ a 2 mg mL⁻¹ em saliva artificial e ACN 1:1 (v/v); filtro orgânico formado por 750 µL de 1-octanol; fase aceptora constituída de papel cromatográfico 3MM Chr embebido com 70 µL de HAc 400 mmol L⁻¹ suportada em uma ponta de ponteira (n = 3).

Em decorrência do equipamento utilizado nesse trabalho, as concentrações detectáveis são muito superiores às requeridas no UPLC-MS/MS também utilizado e por isso, nessa avaliação optou-se por usar um nível de concentração confortável (4 µg mL⁻¹ na saliva), que embora fosse alto em comparação com o nível empregado no UPLC-MS/MS,

permitisse a obtenção de resultados mais confiáveis na avaliação da técnica analítica. Contudo, a sensibilidade do método EE-PS-MS pode ser melhorada com a realização da fragmentação dos analitos no espectrômetro de massas que não foi realizada nesse teste exploratório.

4.9 Perfil de corrente

Para conhecer o perfil da corrente elétrica nas duas configurações do sistema de eletroextração (papel livre e papel suportado em ponta de ponteira), extrações de TCAs a 12 ng mL^{-1} foram realizadas tanto com o papel livre quanto na configuração do papel suportado com registro da corrente elétrica. Na **Figura 42** encontra-se o gráfico com o perfil de corrente elétrica observada. Para ambos os sistemas o perfil foi o mesmo, com incrementos maiores nos primeiros tempos evidenciando o início da migração dos íons e a consequente geração de corrente elétrica, e uma tendência leve à estabilização, próximo a 10 minutos de extração. O valor de corrente apresentado, cerca de $0,7 \text{ mA}$, é um valor alto se comparado aos trabalhos de EME já publicados, porém não foi observado nenhum problema de instabilidade no sistema, como sobreaquecimento do microtubo ou degradação do sorvente. O fato de se usar solvente orgânico na fase doadora faz com que o valor da corrente elétrica seja mais elevado, como visto por Rahmani *et al.* (2015)⁸⁹ porém, como comentado, a corrente observada ficou dentro da normalidade com um perfil estável.

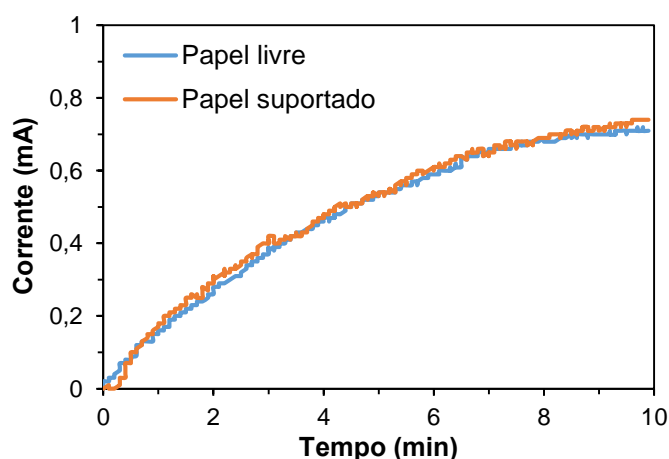


Figura 42. Perfil de corrente para extração de TCAs nas configurações do papel livre e suportado. Condições: diferença de potencial elétrico de 300 V durante 10 min ; fase doadora composta por 1 mL de TCAs 12 ng mL^{-1} em saliva artificial: ACN 1:1 (v/v); filtro orgânico constituído de $750 \text{ }\mu\text{L}$ de 1-octanol; fase aceptora composta por papel cromatográfico 3MM Chr embebido com HAc 400 mmol L^{-1} .

5 CONCLUSÃO

Um papel cromatográfico em formato triangular adequado para ser empregado como fase acceptora para eletroextração e diretamente analisado por *paper spray* foi desenvolvido juntamente com mudanças no *hardware* de eletroextração para receber esse papel. Com esses novos dispositivos um método de determinação de antidepressivos tricíclicos em amostras de saliva foi extensivamente desenvolvido empregando a consagrada técnica de UHPLC-MS/MS.

Durante esse desenvolvimento observou-se que os principais parâmetros avaliados que mais influenciaram o sistema foram o tempo de extração, o potencial aplicado e o percentual de orgânico na fase doadora. Esses são parâmetros já bem estabelecidos na literatura sobre eletroextração e os resultados aqui obtidos corroboram sua importância.

Após a validação constatou-se que o método é seletivo, preciso, exato, ausente de efeito matriz e com limites de quantificação e detecção aceitáveis. Demonstrando a aplicabilidade do método utilizando a eletroextração com o papel cromatográfico como fase acceptora. Possibilitando o uso da eletroextração e subsequente análise por *paper spray*.

As análises por PS-MS com o novo formato de papel resultaram em sinais de intensidade e reprodutibilidade adequados, contudo devido a menor sensibilidade do espectrômetro de massas em questão e do maior ruído de fundo, para uma mesma concentração de TCAs os sinais obtidos foram cerca de 100 vezes menores do que aqueles obtidos por UHPLC-MS/MS. Com otimizações posteriores, como a realização da fragmentação dos analitos no espectrômetro de massas, a sensibilidade do método EE-PS-MS pode ser melhorada.

De forma geral a eletroextração é sem dúvida uma técnica promissora para análises de amostras biológicas especialmente para obter extrações com pouco ou ausência de efeito de matriz. Com um futuro ajuste fino no posicionamento da fase acceptora no *plate*, passível de automatização, a eletroextração tem grande chance de implementação em análises de rotina onde há demanda de alta frequência analítica. Justamente por apresentar essas características é muito interessante associá-la a técnicas de análise rápida como o *paper spray* e os bons resultados associando essas duas técnicas apresentados aqui comprovam essa afirmação.

REFERÊNCIAS

1. OMS. Folha Informativa - Depressão [Internet]. 2018 [citado 20 de novembro de 2019]. Available at: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5635:folha-informativa-depressao&Itemid=1095
2. Routledge PA, Hutchings AD. Therapeutic Drug Monitoring (TDM). In: The Immunoassay Handbook. 4^o ed Elsevier Ltd; 2013. p. 945–62.
3. Crutchfield CA, Breaud AR, Clarke WA. Quantification of tricyclic antidepressants in serum using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS). In: Clinical Applications of Mass Spectrometry in Drug Analysis. 2016. p. 265–70.
4. UNODC. Guidelines for Testing Drugs under International Control in Hair, Sweat and Saliva [Internet]. 2014 [citado 12 de junho de 2019]. p. 96. Available at: https://www.unodc.org/documents/scientific/ST_NAR_30_Rev.3_Hair_Sweat_and_Oral_Fluid.pdf
5. Abdul Keyon AS, Miskam M, Ishak NS, Mahat NA, Mohamed Huri MA, Abdul Wahab R, et al. Capillary electrophoresis for the analysis of antidepressant drugs: A review. *J Sep Sci*. 2019;42(4):906–24.
6. Manousi N, Samanidou VF. Applications of gas chromatography for the analysis of tricyclic antidepressants in biological matrices. *Separations*. 2019;6(2).
7. Asghari A, Saffarzadeh Z, Bazregar M, Rajabi M, Boutorabi L. Low-toxic air-agitated liquid-liquid microextraction using a solidifiable organic solvent followed by gas chromatography for analysis of amitriptyline and imipramine in human plasma and wastewater samples. *Microchem J*. 2017;130:122–8.
8. Farajzadeh MA, Abbaspour M. Development of new extraction method based on liquid–liquid extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction for extraction of three tricyclic antidepressants in plasma samples. *Biomed Chromatogr*. 2018;32(8):1–11.
9. Jalilian N, Asgharinezhad AA, Ebrahimzadeh H, Molaei K, Karami S. Magnetic Solid Phase Extraction Based on Modified Magnetite Nanoparticles Coupled with Dispersive Liquid–Liquid Microextraction as an Efficient Method for Simultaneous Extraction of Hydrophobic and Hydrophilic Drugs. *Chromatographia*. 2018;81(11):1569–78.

10. Mohebbi A, Yaripour S, Farajzadeh MA, Afshar Mogaddam MR. Combination of dispersive solid phase extraction and deep eutectic solvent-based air-assisted liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry as an efficient analytical method for the quantification of some tricyclic antidepressants. *J Chromatogr A*. 2018;1571:84-93.
11. Patel NP, Sanyal M, Sharma N, Patel DS, Shrivastav PS, Patel BN. Highly sensitive LC-MS/MS method to estimate doxepin and its metabolite nordoxepin in human plasma for a bioequivalence study. *J Pharm Anal*. 2018;8(6):378-85.
12. Mohebbi A, Farajzadeh MA, Yaripour S, Mogaddam MRA. Determination of tricyclic antidepressants in human urine samples by the three-step sample pretreatment followed by hplc-uv analysis: An efficient analytical method for further pharmacokinetic and forensic studies. *EXCLI J*. 2018;17:952-63.
13. Fahimirad B, Rajabi M, Elhampour A. A rapid and simple extraction of anti-depressant drugs by effervescent salt-assisted dispersive magnetic micro solid-phase extraction method using new adsorbent Fe₃O₄@SiO₂@N₃. *Anal Chim Acta*. 2019;1047:275-84.
14. Cui X, Ni C, Liang C, Gong F, Wang R, Chen G, et al. Screening and quantitation of forty-six drugs of abuse and toxic compounds in human whole blood by capillary electrophoresis: Application to forensic cases. *Microchem J*. 2019;144:403-10.
15. Ahmadi F, Mahmoudi-Yamchi T, Azizian H. Super paramagnetic core-shells anchored onto silica grafted with C₈/NH₂ nano-particles for ultrasound-assisted magnetic solid phase extraction of imipramine and desipramine from plasma. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2018;1077-1078:52-9.
16. Rosado T, Gonçalves A, Martinho A, Alves G, Duarte AP, Domingues F, et al. Simultaneous Quantification of Antidepressants and Metabolites in Urine and Plasma Samples by GC-MS for Therapeutic Drug Monitoring. *Chromatographia*. 2017;80(2):301-28.
17. Jannesar R, Zare F, Ghaedi M, Daneshfar A. Dispersion of hydrophobic magnetic nanoparticles using ultrasonic-assisted in combination with coextractive microextraction for the simultaneous preconcentration and determination of tricyclic antidepressant drugs in biological fluids. *Ultrason Sonochem*. 2016;32:380-6.
18. Alidoust M, Seidi S, Rouhollahi A, Shanehsaz M. In-tube electrochemically controlled solid phase microextraction of amitriptyline, imipramine and chlorpromazine from human plasma by using an indole-thiophene copolymer nanocomposite. *Microchim Acta*. 2017;184(7):2473-81.
19. Zhang L, Wu P, Jin Q, Hu Z, Wang J. Multi-residue analysis of sedative drugs in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2018;1072:305-14.

20. Fresco-Cala B, Mompó-Roselló Ó, Simó-Alfonso EF, Cárdenas S, Herrero-Martínez JM. Carbon nanotube-modified monolithic polymethacrylate pipette tips for (micro)solid-phase extraction of antidepressants from urine samples. *Microchim Acta*. 2018;185(2).
21. Safari M, Shahlaei M, Yamini Y, Shakorian M, Arkan E. Magnetic framework composite as sorbent for magnetic solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography for simultaneous extraction and determination of tricyclic antidepressants. *Anal Chim Acta*. 2018;1034:204–13.
22. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: New concept for rapid sample preparation of biological fluids. *J Chromatogr A*. 2006;1109(2):183–90.
23. Gjelstad A, Jensen H, Einar K, Pedersen-bjergaard S. *Analytica Chimica Acta* Kinetic aspects of hollow fiber liquid-phase microextraction and electromembrane extraction. 2012;742:10–6.
24. Davarani SSH, Morteza-Najarian A, Nojavan S, Pourahadi A, Abbassi MB. Two-phase electromembrane extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry analysis. *J Sep Sci*. 2013;36(4):736–43.
25. Huang C, Eibak LEE, Gjelstad A, Shen X, Trones R, Jensen H, et al. Development of a flat membrane based device for electromembrane extraction: A new approach for exhaustive extraction of basic drugs from human plasma. *J Chromatogr A*. 2014;1326:7–12.
26. Huang C, Shen X, Gjelstad A, Pedersen-Bjergaard S. Investigation of alternative supported liquid membranes in electromembrane extraction of basic drugs from human plasma. *J Memb Sci*. 2018;548:176–83.
27. Saeed S, Davarani H, Najarian AM, Nojavan S, Tabatabaei M. *Analytica Chimica Acta* Electromembrane extraction combined with gas chromatography for quantification of tricyclic antidepressants in human body fluids. 2012;725:51–6.
28. Sanagi MM, Mohamad Hanapi NS, Ismail AK, Wan Ibrahim WA, Saim N, Yahaya N. Two-phase electrodriven membrane extraction combined with liquid chromatography for the determination of tricyclic antidepressants in aqueous matrices. *Anal Methods*. 2014;6(21):8802–9.
29. Raterink RJ, Lindenburg PW, Vreeken RJ, Hankemeier T. Three-phase electroextraction: A new (Online) sample purification and enrichment method for bioanalysis. *Anal Chem*. 2013;85(16):7762–8.
30. Orlando, Ricardo Mathias Nascentes, Clésia Cristina Moreira, Juliane Soares Costa, Luiz Philip Lopes Pereira EA, Murta MBD. Dispositivos para extração e purificação de analitos com aplicação de campos elétricos. Brasil; BR 1020170054713, 2017. p. 27.

31. Orlando RM, Nascentes CC, Botelho BG, Moreira JS, Costa KA, Boratto VH de M. Development and Evaluation of a 66-Well Plate Using a Porous Sorbent in a Four-Phase Extraction Assisted by Electric Field Approach. *Anal Chem.* 2019;91(10):6471–8.
32. Rani S, Kumar A, Malik AK, Singh B. Quantification of tricyclic and nontricyclic antidepressants in spiked plasma and urine samples using microextraction in packed syringe and analysis by LC and GC-MS. *Chromatographia.* 2011;74(3–4):235–42.
33. Medawar CV, Matheus ME. Antidepressivos Tricíclicos e Gabapentinóides: uma análise do perfil farmacológico no tratamento da dor neuropática. *Rev Bras Farm.* 2012;93(3):290–7.
34. Marsh W. Tricyclic Antidepressants. *xPharma Compr Pharmacol Ref.* 2007;1–3.
35. Lopez-Munoz F, Alamo C. Monoaminergic Neurotransmission: The History of the Discovery of Antidepressants from 1950s Until Today. *Curr Pharm Des.* 2009;15(14):1563–86.
36. Hillhouse T. A brief history of the Dev. of Anti D Drugs. 2015;23(1):1–21.
37. Lovatt P. Tricyclic antidepressants: pharmacological profile. *Nurse Prescr.* 2011;9(1):38–41.
38. Drugbank [Internet]. [citado 6 de fevereiro de 2019]. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs>
39. Pyka A, Babuška M, Zachariasz M. A comparison of theoretical methods of calculation of partition coefficients for selected drugs. *Acta Pol Pharm.* 2006;63:159–67.
40. Brasil. Ministério da Saúde. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - Rename 2020 [Internet]. 2019 [citado 7 de janeiro de 2020]. p. 217. Available at: <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/rename>
41. Brasil. Secretaria Municipal de Saúde/BH. Relação Municipal de Medicamentos BH [Internet]. 2018 [citado 1 de dezembro de 2019]. p. 45. Available at: <https://prefeitura.pbh.gov.br/saude/informacoes/atencao-a-saude/assistencia-farmaceutica/remume>
42. WHO. World health organization model list of essential medicines [Internet]. 2019 [citado 1 de dezembro de 2019]. p. 124. Available at: <https://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>
43. Uddin MN, Samanidou VF, Papadoyannis IN. Bio-sample preparation and analytical methods for the determination of tricyclic antidepressants. *Bioanalysis.* 2011;3(1):97–118.

44. Freemantle N, Anderson IM, Young P. Predictive value of pharmacological activity for the relative efficacy of antidepressant drugs: Meta-regression analysis. *Br J Psychiatry*. 2000;177:292–302.
45. Cipriani A, Furukawa TA, Salanti G, Chaimani A, Atkinson LZ, Ogawa Y, et al. Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet*. 2018;391(10128):1357–66.
46. SNGPC. Mapa de consumo de medicamentos [Internet]. ANVISA. 2012 [citado 20 de dezembro de 2019]. Available at: <http://portal.anvisa.gov.br/sngpc>
47. Maurer HH. Advances in analytical toxicology: The current role of liquid chromatography-mass spectrometry in drug quantification in blood and oral fluid. *Anal Bioanal Chem*. 2005;381(1):110–8.
48. Danhof M, Breimer DD. Therapeutic Drug Monitoring in Saliva. *Clin Pharmacokinet*. 1978;3:39–57.
49. Langman LJ. The use of oral fluid for therapeutic drug management: Clinical and forensic toxicology. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1098:145–66.
50. Campos DM, Campos RPS de, Silva JAF da, Jesus DP, Orlando RM. Preparo de amostras assitido por campo elétrico: Fundamentos, avanços, aplicações e tendências. *Quim Nova*. 2015;38(8):1093–106.
51. Mohebbi A, Yaripour S, Ali M, Reza M, Mogaddam A. Combination of dispersive solid phase extraction and deep eutectic solvent – based air – assisted liquid – liquid microextraction followed by gas chromatography – mass spectrometry as an efficient analytical method for the quantification of some tricyclic. *J Chromatogr A*. 2018;1571:84–93.
52. Jagtap PK, Tapadia K. Pharmacokinetic determination and analysis of nortriptyline based on GC-MS coupled with hollow-fiber drop-to-drop solvent microextraction technique. *Bioanalysis*. 2018;10(3):143–52.
53. Salamat Q, Yamini Y, Moradi M, Farahani A, Feizi N. Extraction of antidepressant drugs in biological samples using alkanol-based nano structured supramolecular solvent microextraction followed by gas chromatography with mass spectrometric analysis. *J Sep Sci*. 2019;42(8):1620–8.
54. Berm EJ, Paardekooper J, Brummel-mulder E, Hak E, Wilffert B, Maring JG. A simple dried blood spot method for therapeutic drug monitoring of the tricyclic antidepressants amitriptyline, nortriptyline, imipramine, clomipramine, and their active metabolites using LC-MS/MS. *Talanta*. 2015;134:165–72.

55. Zang X, Peng J, Zhou M, Peng H. A high selective and sensitive method for the detection of six psychotropic drugs in human urine by high performance liquid chromatography combined with resonance Rayleigh scattering spectra. *RSC Adv.* 2015;5(89):73091–8.
56. Haghazari L, Nomani H, Fattahi N, Sharafi K, Moradi M. Sensitive determination of psychotropic drugs in urine samples using continuous liquid-phase microextraction with an extraction solvent lighter than water. *New J Chem.* 2018;42(6):4450–6.
57. Zilfidou E, Kabir A, Furton KG, Samanidou V. An improved fabric phase sorptive extraction method for the determination of five selected antidepressant drug residues in human blood serum prior to high performance liquid chromatography with diode array detection. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2019;1125:121720.
58. Moradi P, Asghari A. Highly selective determination of some anti-depressant drugs in complicated matrices by dual emulsification liquid-phase microextraction based on filtration followed by high-performance liquid chromatography. *Sep Sci Plus.* 2019;2(4):129–36.
59. Lioupi A, Kabir A, Furton KG, Samanidou V. Fabric phase sorptive extraction for the isolation of five common antidepressants from human urine prior to HPLC-DAD analysis. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2019;1118–1119:171–9.
60. Mifsud Buhagiar L, Sammut C, Chircop Y, Axisa K, Sammut Bartolo N, Vella Szijj J, et al. Practical liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of amitriptyline, nortriptyline and their hydroxy metabolites in human serum. *Biomed Chromatogr.* 2019;33(12):1–9.
61. Schmidt J, Proplesch R. Electroextraction: a novel technique. 1992;47(12):3015–22.
62. Seip KF, Jensen H, Sønsteby MH, Gjelstad A, Pedersen-Bjergaard S. Electromembrane extraction: Distribution or electrophoresis? *Electrophoresis.* 2013;34(5):792–9.
63. Huang C, Jensen H, Seip KF, Gjelstad A, Pedersen-Bjergaard S. Mass transfer in electromembrane extraction - The link between theory and experiments. *J Sep Sci.* 2016;39(1):188–97.
64. Drouin N, Kubáň P, Rudaz S, Pedersen-Bjergaard S, Schappler J. Electromembrane extraction: Overview of the last decade. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2019;113:357–63.
65. Seidi S, Yamini Y, Heydari A, Moradi M, Esrafil A, Rezazadeh M. Determination of thebaine in water samples, biological fluids, poppy capsule, and narcotic drugs, using electromembrane extraction followed by high-performance liquid chromatography analysis. *Anal Chim Acta.* 2011;701(2):181–8.

66. Tabani H, Fakhari AR, Zand E. Low-voltage electromembrane extraction combined with cyclodextrin modified capillary electrophoresis for the determination of phenoxy acid herbicides in environmental samples. *Anal Methods*. 2013;5(6):1548–55.
67. Abedi H, Ebrahimzadeh H. Electromembrane-surrounded solid-phase microextraction coupled to ion mobility spectrometry for the determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: A rapid screening method in complicated matrices. *J Sep Sci*. 2015;38(8):1358–64.
68. Middelthon-Bruer TM, Gjelstad A, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S. Parameters affecting electro membrane extraction of basic drugs. *J Sep Sci*. 2008;31(4):753–9.
69. Yamini Y, Seidi S, Rezazadeh M. *Analytica Chimica Acta* Electrical field-induced extraction and separation techniques: Promising trends in analytical chemistry – A review. *Anal Chim Acta*. 2014;814:1–22.
70. Gjelstad A, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S. Electrokinetic migration across artificial liquid membranes. Tuning the membrane chemistry to different types of drug substances. *J Chromatogr A*. 2006;1124(1–2):29–34.
71. Davarani SSH, Najarian AM, Nojavan S, Tabatabaei MA. Electromembrane extraction combined with gas chromatography for quantification of tricyclic antidepressants in human body fluids. *Anal Chim Acta*. 2012;725:51–6.
72. Huang C, Fredrik K, Gjelstad A, Pedersen-bjergaard S. *Analytica Chimica Acta* Electromembrane extraction of polar basic drugs from plasma with pure bis (2-ethylhexyl) phosphite as supported liquid membrane. *Anal Chim Acta*. 2016;934:80–7.
73. Gjelstad A, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S. Simulation of flux during electro-membrane extraction based on the Nernst-Planck equation. *J Chromatogr A*. 2007;1174(1–2):104–11.
74. Restan MS, Jensen H, Shen X, Huang C, Martinsen ØG, Kubáň P, et al. Comprehensive study of buffer systems and local pH effects in electromembrane extraction. *Anal Chim Acta*. 2017;984:116–23.
75. Fredrik K, Gjelstad A, Pedersen-bjergaard S, Kubáň P. Micro-electromembrane extraction using multiple free liquid membranes and acceptor solutions e Towards selective extractions of analytes based on their acid-base strength. *Anal Chim Acta*. 2016;943:64–73.
76. Rezazadeh M, Yamini Y, Seidi S, Ebrahimpour B. Electromembrane surrounded solid phase microextraction: A novel approach for efficient extraction from complicated matrices. *J Chromatogr A*. 2013;1280:16–22.

77. Arain SS, Kazi TG, Arain JB, Afridi HI, Brahman KD, Naeemullah. Preconcentration of toxic elements in artificial saliva extract of different smokeless tobacco products by dual-cloud point extraction. *Microchem J.* 2014;112:42–9.
78. Teófilo RF, Ferreira MMC. Quimiometria II - Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais. *Quim Nova.* 2006;29(2):338–50.
79. Novaes CG, Yamaki RT, De Paula VF, Do Nascimento Júnior BB, Barreto JA, Valasques GS, et al. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies De Resposta - Parte I: Variáveis de Processo. *Rev Virtual Quim.* 2017;9(3):1184–215.
80. Filho ERP. Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados. São Carlos: EdUFSCar; 2015. 88 p.
81. Novaes CG, Yamaki RT, De Paula VF, Do Nascimento Junior, B. B. Barreto JA, Valasques GS, Bezerra MA. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies de Respostas - Parte II: Variáveis de Mistura. *Rev Virtual Química.* 2018;10(2):393–420.
82. Magnusson B, Ornemark U, organizadores. *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.* 2º ed. 2014. 70 p.
83. De Souza SVC, Junqueira RG. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Anal Chim Acta.* 2005;552(1–2):25–35.
84. Uddin MN, Samanidou VF, Papadoyannis IN. HPLC method for simultaneous determination of 1,4-benzodiazepines and tricyclic antidepressants in pharmaceutical formulations and saliva a useful tool in medicinal chemistry. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2009;32(10):1475–504.
85. Wang H, Liu J, Graham Cooks R, Ouyang Z. Paper spray for direct analysis of complex mixtures using mass spectrometry. *Angew Chemie - Int Ed.* 2010;49(5):877–80.
86. Pereira HV. Espectrometria de massas com ionização por paper spray combinada a métodos quimiométricos para identificação de falsificações em cervejas. Universidade Federal de Minas Gerais; 2016.
87. Liu J, He X, He Y, Yu M, Jiang L, Chen B. Development and Application of Paper Spray Ionization Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 2010;82:2463–71.
88. Seip KF, Gjelstad A, Pedersen-Bjergaard S. Electromembrane extraction from aqueous samples containing polar organic solvents. *J Chromatogr A.* 2013;1308:37–44.
89. Rahmani T, Rahimi A, Nojavan S. Study on electrical current variations in electromembrane extraction process: Relation between extraction recovery and magnitude of electrical current. *Anal Chim Acta.* 2016;903:81–90.

90. Wanninger S, Lorenz V, Subhan A, Edelmann FT. Metal complexes of curcumin - synthetic strategies, structures and medicinal applications. *Chem Soc Rev.* 2015;44(15):4986–5002.
91. Nojavan S, Shaghghi H, Rahmani T, Shokri A, Nasiri-Aghdam M. Combination of electromembrane extraction and electro-assisted liquid-liquid microextraction: A tandem sample preparation method. *J Chromatogr A.* 2018;1563:20–7.
92. Smallwood IM. *Handbook of organic solvent properties.* Arnold. 1966. 326 p.
93. de Castro A, Concheiro M, Quintela O, Cruz A, López-Rivadulla M. LC–MS/MS method for the determination of nine antidepressants and some of their main metabolites in oral fluid and plasma. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;48(1):183–93.
94. Coulter C, Taruc M, Tuyay J, Moore C. Antidepressant drugs in oral fluid using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2010;34(2):64–72.
95. Peters FT, Maurer HH. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review. *Accredit Qual Assur.* 2002;7(11):441–9.
96. AOAC International. Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F) [Internet]. 2016 [citado 1 de novembro de 2019]. p. 18. Available at: <http://www.eoma.aoac.org/appendices.asp>
97. Edgar M, Dawes C, O'Mullane D. *Saliva and oral health.* 4^o ed. Stephen Hancocks Limited; 2012. 172 p.
98. Orlando RM, Avelar MCF, Amador VS, Nascentes CC, Augusti R, Piccin E. Dispositivo para extração e purificação de analitos com aplicação de campos elétricos adequado para o acoplamento com espectrometria de massas. Brasil; BR 1020190259477, 2019. p. 28.

APÊNDICE

A. Otimização das condições de análise no espectrômetro de massas através do planejamento Doehlert

A1. Planejamento Doehlert para os parâmetros voltagem do capilar e temperatura de dessorção

Tabela 25. Parâmetros da ANOVA para a doxepina.

FV	SQ	nGL	MQ	F _{calc}		p
Regressão	2,8E+10	4	7,1E+09	125,20	SG	6,6E-06
Resíduos	3,4E+08	6	5,6E+07			
F. Ajuste	1,5E+06	2	7,5E+06	0,0089		0,99112
Erro Puro	3,4E+08	4	8,4E+07			
Total	2,9E+10	10				
% variação explicada				98,82		
% máx. de variação explicável				98,82		

FV: fonte de variação; **SQ:** soma quadrática; **nGL:** número de graus de liberdade; **MQ:** média quadrática; **F_{calc}:** valor de F calculado; **SG:** significativo; **p:** valor de p calculado.

Tabela 26. Parâmetros da ANOVA para a imipramina.

FV	SQ	nGL	MQ	F _{calc}		p
Regressão	3,6E+11	5	9,0E+10	30,96	SG	0,00038
Resíduos	1,7E+10	5	2,9E+09			
F. Ajuste	2,3E+09	1	1,2E+09	0,31		0,75
Erro Puro	1,5E+10	4	3,8E+09			
Total	3,8E+11	10				
% variação explicada				95,38		
% máx. de variação explicável				95,99		

FV: fonte de variação; **SQ:** soma quadrática; **nGL:** número de graus de liberdade; **MQ:** média quadrática; **F_{calc}:** valor de F calculado; **SG:** significativo; **p:** valor de p calculado.

Tabela 27. Parâmetros ANOVA para a amitriptilina.

FV	SQ	nGL	MQ	F_{calc}		p
Regressão	2,0E+10	4	5,1E+09	91,40	SG	2E-05
Resíduos	3,3E+08	6	5,5E+07			
F. Ajuste	6,2E+07	2	3,1E+07	0,45		0,66
Erro Puro	2,7E+08	4	6,8E+07			
Total	2,1E+10	10				
% variação explicada				98,39		
% máx. de variação explicável				98,69		

FV: fonte de variação; **SQ:** soma quadrática; **nGL:** número de graus de liberdade; **MQ:** média quadrática; **F_{calc}:** valor de F calculado; **SG:** significativo; **p:** valor de p calculado.

Tabela 28. Parâmetros ANOVA para a nortriptilina.

FV	SQ	nGL	MQ	F_{calc}		p
Regressão	7,2E+09	4	1,8E+09	258,23	SG	8E-07
Resíduos	4,2E+07	6	7,0E+06			
F. Ajuste	7,0E+05	2	3,5E+05	0,03		0,97
Erro Puro	4,1E+07	4	1,0E+07			
Total	7,2E+09	10				
% variação explicada				99,42		
% máx. de variação explicável				99,43		

FV: fonte de variação; **SQ:** soma quadrática; **nGL:** número de graus de liberdade; **MQ:** média quadrática; **F_{calc}:** valor de F calculado; **SG:** significativo; **p:** valor de p calculado.

Tabela 29. Parâmetros da ANOVA para a clomipramina.

FV	SQ	nGL	MQ	F_{calc}		p
Regressão	1,5E+11	4	3,7E+10	151,48	SG	3,7E-06
Resíduos	1,5E+09	6	2,5E+08			
F. Ajuste	5,5E+07	2	2,8E+07	0,08		9,3E-01
Erro Puro	1,4E+09	4	3,6E+08			
Total	1,5E+11	10				
% variação explicada				99,02		
% máx. de variação explicável				99,06		

FV: fonte de variação; **SQ:** soma quadrática; **nGL:** número de graus de liberdade; **MQ:** média quadrática; **F_{calc}:** valor de F calculado; **SG:** significativo; **p:** valor de p calculado.

A2. Planejamento Doehlert para os parâmetros energia de colisão e voltagem do cone

Tabela 30. Parâmetros da ANOVA para a doxepina.

FV	SQ	nGL	MQ	F _{calc}	SG	p
Regressão	1,8E+10	5	3,6E+09	15,38	SG	0,0047
Resíduos	1,2E+09	5	2,3E+08			
F. Ajuste	1,2E+09	1	1,2E+09	1225	SG	4E-06
Erro Puro	3,8E+06	4	9,5E+05			
Total	1,9E+10	10				
% variação explicada				93,90		
% máx. de variação explicável				99,98		

FV: fonte de variação; **SQ:** soma quadrática; **nGL:** número de graus de liberdade; **MQ:** média quadrática; **F_{calc}:** valor de F calculado; **SG:** significativo; **p:** valor de p calculado.

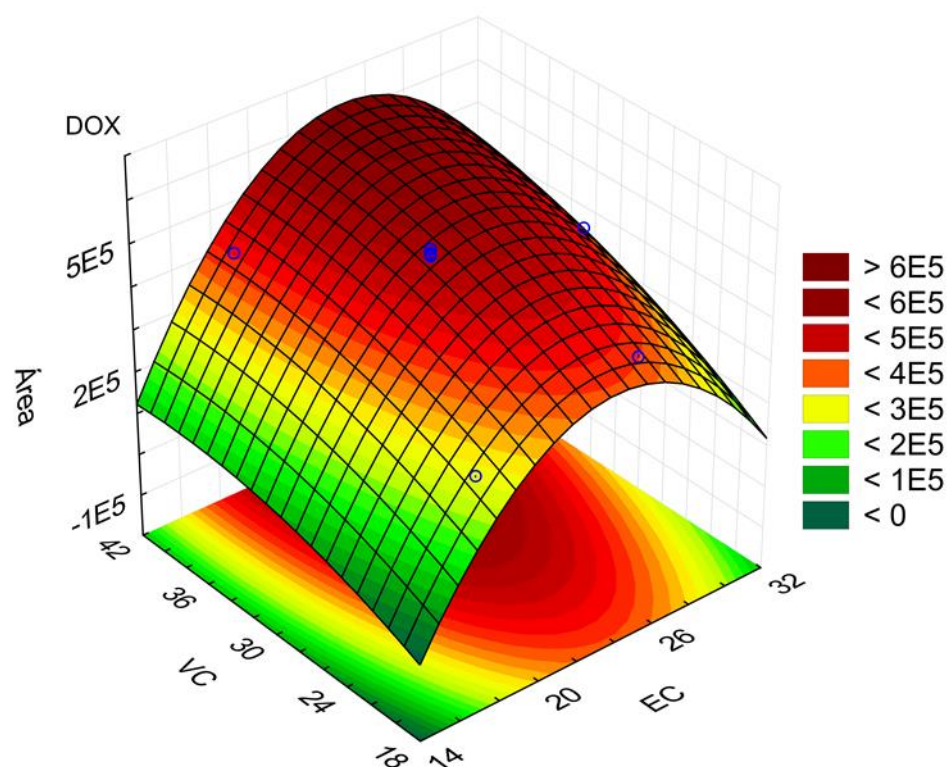


Figura 43. Superfície de resposta para a doxepina.

Tabela 31. Parâmetros da ANOVA para a imipramina.

FV	SQ	nGL	MQ	F _{calc}		p
Regressão	1,2E+11	5	2,5E+10	511,26	SG	9,13E-07
Resíduos	2,4E+08	5	4,8E+07			
F. Ajuste	1,2E+08	1	1,2E+08	3,66		0,13
Erro Puro	1,3E+08	4	3,1E+07			
Total	1,2E+11	10				

% variação explicada	99,80
% máx. de variação explicável	99,90

FV: fonte de variação; **SQ:** soma quadrática; **nGL:** número de graus de liberdade; **MQ:** média quadrática; **F_{calc}:** valor de F calculado; **F_{tab}:** valor de F tabelado.

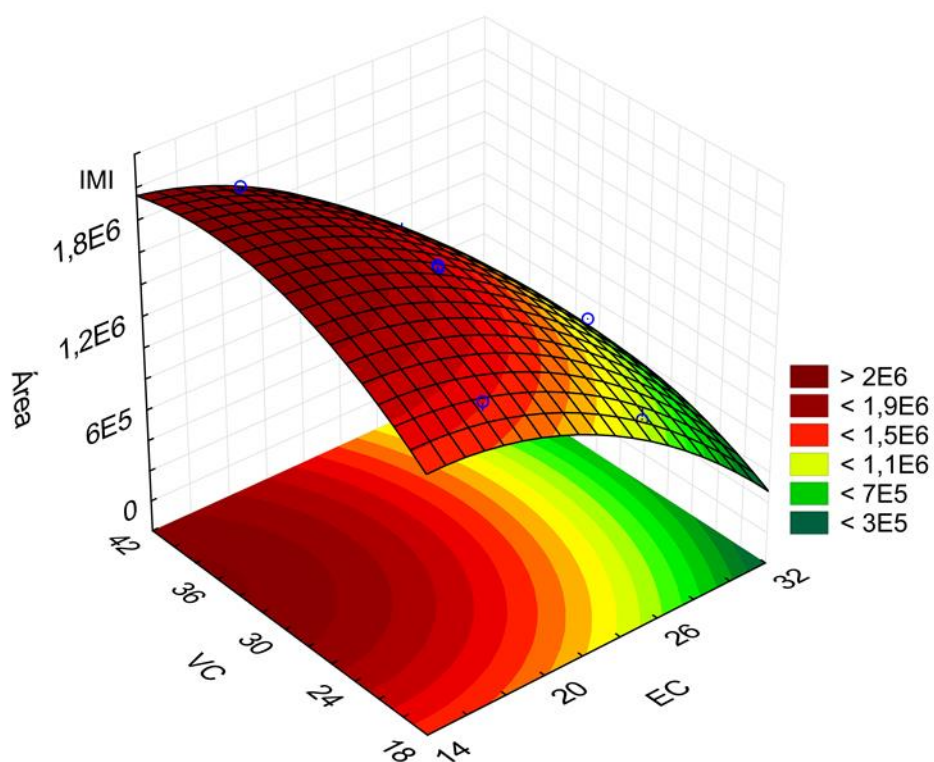


Figura 44. Superfície de resposta para a imipramina

Tabela 32. Parâmetros da ANOVA para a amitriptilina.

FV	SQ	nGL	MQ	F _{calc}		p
Regressão	5,9E+10	5	1,2E+10	1511,2	SG	6E-08
Resíduos	3,9E+07	5	7,8E+06			
F. Ajuste	2,6E+06	1	2,6E+06	0,2852		0,6216
Erro Puro	3,7E+07	4	9,2E+06			
Total	5,9E+10	10				

% variação explicada 99,93

% máx. de variação explicável 99,94

FV: fonte de variação; **SQ:** soma quadrática; **nGL:** número de graus de liberdade; **MQ:** média quadrática; **F_{calc}:** valor de F calculado; **SG:** significativo; **p:** valor de p calculado.

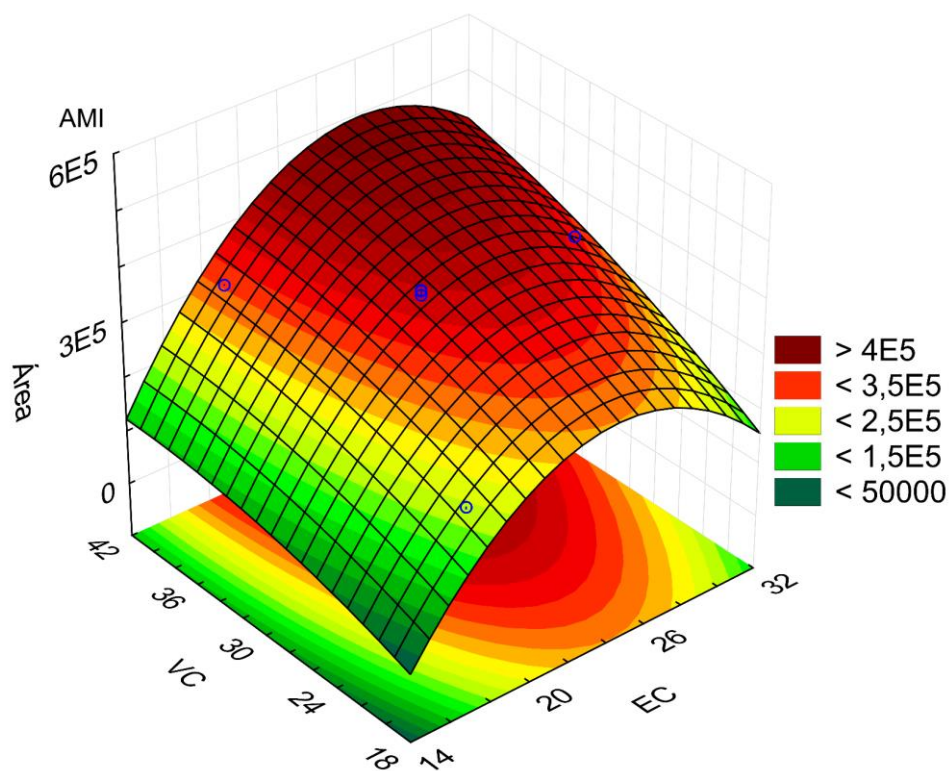


Figura 45. Superfície de resposta para amitriptilina

Tabela 33. Parâmetros da ANOVA para a nortriptilina.

FV	SQ	nGL	MQ	F _{calc}		p
Regressão	1,3E+10	5	2,7E+09	29,274	SG	0,00104
Resíduos	4,6E+08	5	9,1E+07			
F. Ajuste	4,2E+08	1	4,2E+08	47,018	SG	0,00237
Erro Puro	3,6E+07	4	8,9E+06			
Total	1,4E+10	10				
% variação explicada				96,70		
% máx. de variação explicável				99,74		

FV: fonte de variação; **SQ:** soma quadrática; **nGL:** número de graus de liberdade; **MQ:** média quadrática; **F_{calc}:** valor de F calculado; **SG:** significativo; **p:** valor de p calculado.

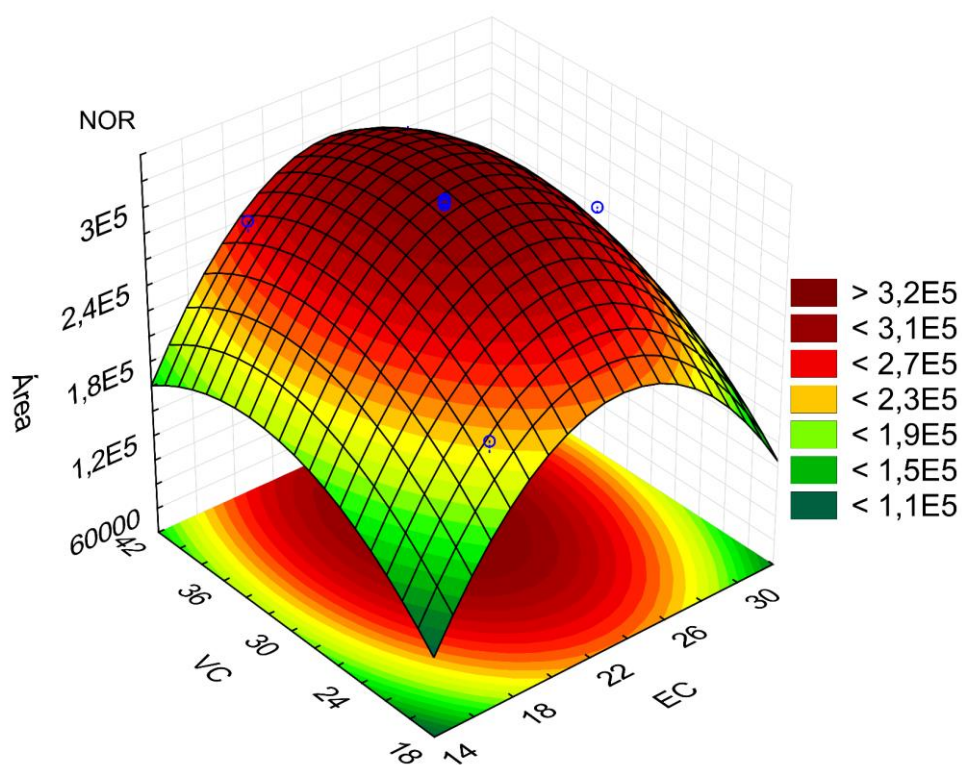
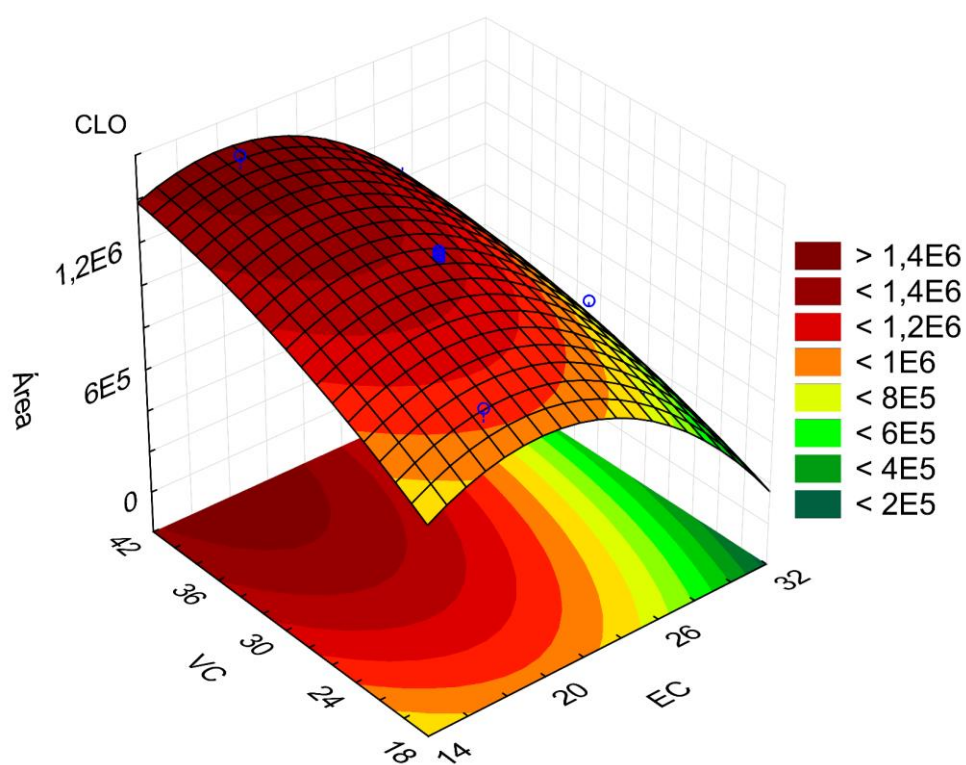


Figura 46. Superfície de resposta para a nortriptilina.

Tabela 34. Parâmetros da ANOVA para a clomipramina.

FV	SQ	nGL	MQ	F _{calc}		p
Regressão	8,4E+10	5	1,7E+10	3351,09	SG	8,3E-09
Resíduos	2,5E+07	5	5,0E+06			
F. Ajuste	7,6E+05	1	7,6E+05	0,12525		0,74128
Erro Puro	2,4E+07	4	6,1E+06			
Total	8,4E+10	10				
% variação explicada				99,97		
% máx. de variação explicável				99,97		

FV: fonte de variação; **SQ:** soma quadrática; **nGL:** número de graus de liberdade; **MQ:** média quadrática; **F_{calc}:** valor de F calculado; **SG:** significativo; **p:** valor de p calculado.

**Figura 47.** Superfície de resposta para a clomipramina.

B. Otimização da composição do filtro orgânico através do planejamento de misturas rede simplex

Tabela 35. Parâmetros da ANOVA para a doxepina.

FV	SQ	GL	MQ	F	p	
Modelo	4,2E+09	4	1,0E+09	183,41	< 0.0001	significante
Linear	4,0E+09	2	2,0E+09	357,48	< 0.0001	
AB	4,8E+07	1	4,8E+07	8,53	0,0223	
AC	7,2E+07	1	7,2E+07	12,75	0,0091	
Resíduo	3,9E+07	7	5,6E+06			
Falta de ajuste	4,2E+05	1	4,2E+05	0,0651	0,8071	Não significativa
Erro puro	3,9E+07	6	6,5E+06			
Total	4,2E+09	11				

Tabela 36. Parâmetros da ANOVA para a imipramina.

FV	SQ	GL	MQ	F	p	
Modelo	4,1E+10	4	1,0E+10	168,97	< 0.0001	significante
Linear	4,0E+10	2	2,0E+10	330,85	< 0.0001	
AB	5,3E+08	1	5,3E+08	8,76	0,0211	
AC	4,5E+08	1	4,5E+08	7,42	0,0296	
Resíduo	4,2E+08	7	6,1E+07			
Falta de ajuste	2,8E+07	1	2,8E+07	0,4307	0,5360	Não significativa
Erro puro	3,9E+08	6	6,6E+07			
Total	4,2E+10	11				

FV: fonte de variação; **SQ:** soma quadrática; **GL:** número de graus de liberdade; **MQ:** média quadrática; **F:** valor de F calculado; **p:** valor de p calculado. **A:** 1-octanol; **B:** 2-etilhexanol; **C:** acetato de etila.

Tabela 37. Parâmetros da ANOVA para a amitriptilina.

FV	SQ	GL	MQ	F	p	
Modelo	3,1E+09	2	1,5E+09	106,65	< 0.0001	significante
Linear	3,1E+09	2	1,5E+09	106,65	< 0.0001	
Resíduo	1,3E+08	9	1,4E+07			
Falta de ajuste	7,1E+07	3	2,4E+07	2,45	0,1613	Não significante
Erro puro	5,8E+07	6	9,7E+06			
Total	3,2E+09	11				

Tabela 38. Parâmetros da ANOVA para a nortriptilina.

FV	SQ	GL	MQ	F	p	
Modelo	1,9E+09	4	4,7E+08	259,66	< 0.0001	significante
Linear	1,8E+09	2	9,2E+08	500,53	< 0.0001	
AB	4,6E+07	1	4,6E+07	25,15	0,0015	
BC	1,4E+07	1	1,4E+07	7,71	0,0274	
Resíduo	1,3E+07	7	1,8E+06			
Falta de ajuste	2,8E+06	1	2,8E+06	1,68	0,2426	não significante
Erro puro	1,0E+07	6	1,7E+06			
Total	1,9E+09	11				

Tabela 39. Parâmetros da ANOVA para a clomipramina.

FV	SQ	GL	MQ	F	p	
Modelo	2,8E+10	3	9,4E+09	152,46	< 0.0001	significante
Linear	2,8E+10	2	1,4E+10	225,70	< 0.0001	
AC	3,7E+08	1	3,7E+08	6,00	0,0400	
Resíduo	5,0E+08	8	6,2E+07			
Falta de ajuste	1,9E+08	2	9,3E+07	1,80	0,2441	não significante
Erro puro	3,1E+08	6	5,2E+07			
Total	2,9E+10	11				

FV: fonte de variação; SQ: soma quadrática; GL: número de graus de liberdade; MQ: média quadrática; F: valor de F calculado; p: valor de p calculado. A: 1-octanol; B: 2-etilhexanol; C: acetato de etila.

C. Otimização dos fatores que afetam a eletroextração através do planejamento Box-Behnken

Tabela 40. Parâmetros da ANOVA para a doxepina.

FV	SQ	GL	MQ	F	p	
Modelo	9,57	9	1,06	20,75	0,0003	significante
A- Potencial	0,1083	1	0,1083	2,11	0,1892	
B-Tempo	1,05	1	1,05	20,54	0,0027	
C-% Org FD	8,31	1	8,31	162,22	< 0,0001	
AB	0,0135	1	0,0135	0,2643	0,6230	
AC	0,0137	1	0,0137	0,2670	0,6213	
BC	0,0142	1	0,0142	0,2782	0,6142	
A²	0,0026	1	0,0026	0,0509	0,8280	
B²	0,0108	1	0,0108	0,2101	0,6606	
C²	0,0389	1	0,0389	0,7589	0,4126	
Resíduo	0,3585	7	0,0512			
Falta de ajuste	0,2916	3	0,0972	5,81	0,0611	não significante
Erro puro	0,0669	4	0,0167			
Total	9,92	16				

FV: fonte de variação; **SQ:** soma quadrática; **GL:** número de graus de liberdade; **MQ:** média quadrática; **F:** valor de F calculado; **p:** valor de p calculado.

Tabela 41. Parâmetros da ANOVA para a imipramina.

FV	SQ	GL	MQ	F	p	
Modelo	11,50	9	1,28	31,93	< 0,0001	significante
A- Potencial	0,2225	1	0,2225	5,56	0,0505	
B-Tempo	1,40	1	1,40	34,93	0,0006	
C-% Org FD	9,65	1	9,65	241,25	< 0,0001	
AB	0,0387	1	0,0387	0,9671	0,3582	
AC	0,0009	1	0,0009	0,0224	0,8852	
BC	0,0092	1	0,0092	0,2287	0,6471	
A²	0,0164	1	0,0164	0,4110	0,5419	
B²	0,0294	1	0,0294	0,7349	0,4197	
C²	0,1176	1	0,1176	2,94	0,1301	
Resíduo	0,2801	7	0,0400			
Falta de ajuste	0,2274	3	0,0758	5,75	0,0622	não significante
Erro puro	0,0528	4	0,0132			
Total	11,78	16				

Tabela 42. Parâmetros da ANOVA para a amitriptilina.

FV	SQ	GL	MQ	F	p	
Modelo	10,41	9	1,16	31,61	< 0,0001	significante
A- Potencial	0,1843	1	0,1843	5,04	0,0597	
B-Tempo	1,16	1	1,16	31,63	0,0008	
C-% Org FD	9,00	1	9,00	245,78	< 0,0001	
AB	0,0322	1	0,0322	0,8800	0,3794	
AC	0,0202	1	0,0202	0,5525	0,4815	
BC	0,0023	1	0,0023	0,0628	0,8093	
A²	0,0004	1	0,0004	0,0096	0,9248	
B²	0,0178	1	0,0178	0,4876	0,5075	
C²	0,0024	1	0,0024	0,0648	0,8064	
Resíduo	0,2562	7	0,0366			
Falta de ajuste	0,1664	3	0,0555	2,47	0,2015	não significante
Erro puro	0,0898	4	0,0225			
Total	10,67	16				

FV: fonte de variação; **SQ:** soma quadrática; **GL:** número de graus de liberdade; **MQ:** média quadrática; **F:** valor de F calculado; **p:** valor de p calculado.

Tabela 43. Parâmetros da ANOVA para a nortriptilina.

FV	SQ	GL	MQ	F	p	
Modelo	10,72	9	1,19	24,84	0,0002	significante
A- Potencial	0,3389	1	0,3389	7,07	0,0325	
B-Tempo	1,59	1	1,59	33,14	0,0007	
C-% Org FD	8,35	1	8,35	174,16	< 0,0001	
AB	0,0334	1	0,0334	0,6977	0,4311	
AC	0,0031	1	0,0031	0,0651	0,8059	
BC	0,0019	1	0,0019	0,0405	0,8463	
A²	0,1084	1	0,1084	2,26	0,1764	
B²	0,0452	1	0,0452	0,9424	0,3640	
C²	0,2119	1	0,2119	4,42	0,0736	
Resíduo	0,3356	7	0,0479			
Falta de ajuste	0,2681	3	0,0894	5,30	0,0706	não significante
Erro puro	0,0675	4	0,0169			
Total	11,05	16				

Tabela 44. Parâmetros da ANOVA para a clomipramina.

FV	SQ	GL	MQ	F	p	
Modelo	11,17	9	1,24	24,00	0,0002	significante
A- Potencial	0,2022	1	0,2022	3,91	0,0885	
B-Tempo	1,33	1	1,33	25,75	0,0014	
C-% Org FD	9,56	1	9,56	184,88	< 0,0001	
AB	0,0214	1	0,0214	0,4132	0,5408	
AC	0,0299	1	0,0299	0,5781	0,4719	
BC	0,0004	1	0,0004	0,0069	0,9361	
A²	0,0046	1	0,0046	0,0894	0,7736	
B²	0,0049	1	0,0049	0,0938	0,7683	
C²	0,0143	1	0,0143	0,2763	0,6153	
Resíduo	0,3620	7	0,0517			
Falta de ajuste	0,2660	3	0,0887	3,69	0,1197	não significante
Erro puro	0,0961	4	0,0240			
Total	11,53	16				

FV: fonte de variação; **SQ:** soma quadrática; **GL:** número de graus de liberdade; **MQ:** média quadrática; **F:** valor de F calculado; **p:** valor de p calculado.