Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

***“Análise enantiosseletiva da mirtazapina em plasma:
comparação de métodos de preparação das amostras”***

Fernando José Malagueño de Santana

Ribeirão Preto - SP

2005

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

***“Análise enantiosseletiva da mirtazapina em plasma:
comparação de métodos de preparação das amostras”***

Fernando José Malagueño de Santana

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em
Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a
obtenção do título de mestre em Toxicologia, área de
concentração: **Toxicologia**

Orientador: Profa. Dr. Pierina Sueli Bonato

Ribeirão Preto - SP

2005

FICHA CATALOGRÁFICA

de Santana, Fernando José Malagueño de Santana
Análise enantiosseletiva da mirtazapina em plasma: comparação de
métodos de preparação das amostras. Ribeirão Preto, 2005.
113 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Programa de Toxicologia Área
de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Bonato, Pierina Sueli Bonato.

1. Análise enantiosseletiva. 2. Mirtazapina. 3. plasma.

Autor: Fernando José Malagueño de Santana

Título: Análise enantiosseletiva da mirtazapina em plasma: comparação de métodos de preparação das amostras.

Prof(a) Dr.(a)

Prof(a) Dr.(a)

Prof(a) Dr.(a)

Orientador(a)

Trabalho defendido e aprovado pela Comissão Julgadora em ____/____/____

*“...Os problemas são problemas demais antes de
correr atrás da maneira certa de solucionar...”*

Chico Science

DEDICATÓRIAS

Dedico todo meu trabalho ao meu porto seguro, aqueles que sempre estiveram presentes, confiantes (mesmo quando eu não estava), extremamente tolerantes diante de minha eterna intolerância; meus mais preciosos amigos, conselheiros e protetores: *MEUS PAIS*,

que me deram as bases para o que me tornei, me incentivando (mesmo nas escolhas mais difíceis), me moldando, me amando; meu espelho de bom caracter, de trabalhador, de bom pai, filho e companheiro - Se algum dia conseguir ser metade do que eles sempre foram para mim, poderei dizer, sem dúvida alguma, consegui.

À minha *ESPOSA* Danielle (Dan),

“Por sua amizade e companheirismo”; por seu enorme respeito e dedicação. Eterna amiga e companheira das horas mais difíceis; à mais paciente e grandiosa que já conheci. A quem dedico não somente este trabalho mas também todo meu carinho e admiração. Navegadora nos meus sonhos; crente no nosso crescer. Por tudo que construímos e ainda construiremos juntos, por seu mais verdadeiro amor. Pelo meu mais precioso presente, *MEU FILHO*, João Henrique, maior estímulo que um pai pode ter, que com um sorriso, um abraço ou um simples olhar nos faz maior; confiantes; felizes. A ele dedico também uma vida inteira de amor e conquistas.

Ofereço também a meu *IRMÃO* Kado,

Meu maior exemplo de dedicação, garra e persistência; um irmão, realmente, mais velho, sempre cuidadoso demais, muitas vezes até meu tutor, mas sempre um grande amigo; um grande irmão. Com ele aprendi que na vida nunca estamos sozinhos e que

nossos sonhos sempre são atingíveis, se eles, realmente, são nossos sonhos. Que a vida lhe
tudo aquilo que você puder alcançar.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Pierina,

Sem a qual não estaria aqui, pois desde o primeiro momento acreditou em mim, me incentivando, aceitando um “retirante nordestino” como orientado e, realmente, orientando os desorientados pós-graduandos.

Uma fonte inesgotável de conhecimento, sempre disposta a solucionar aqueles “grandes problemas” do dia-a-dia (quando as reuniões assim o permitiam), as vezes rígida, mas sempre muito humana e tolerante; é com imenso orgulho que digo que fui seu orientado.

À meus eternos amigos, Vitor, Douglas, Chico, Valderes, Tota, e tantos outros que a vida me deu, com os quais cresci, aprendi e convivi tantos anos e hoje sou um pouco de cada um, com suas qualidades e defeitos.

À todos que passaram pelo CROEC e pela Química Analítica enquanto aqui estive, Ana Cecília, Anderson, Analu, Bortocan, Carmem, Cristiane, Fabi, Edgar, Igor, Keyller, Leandro, Marião, Marília, Renata, Ricardo, Valquíria, e claro, Luizinho, Solange e Perpetua. Pelo convívio diário, profissional e pessoal, que muitas vezes se transformou em sincera amizade, com os quais aprendi muitas coisas, e sempre pude contar. Estou certo que muitas dessas pessoas serão meus amigos durante toda a vida.

À todos os professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, os quais sempre me ajudaram, me apoiaram, me orientaram ou, simplesmente, me escutaram.

À todos aqueles que de alguma forma compartilharam com minha pequena família o sentido da palavra casa, Jr e Aninha; Marcela, Gabi, dona Teresinha, Luiz.

À Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Por todo apoio e orientação durante meu trabalho

Aos demais funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelo agradável convívio e colaboração com esta dissertação.

À FAPESP e CNPq

responsáveis pela manutenção da minha pequena família (“*bolsa família*”) durante praticamente todo meu mestrado.

À Deus,

Pegadas na Areia

Autor desconhecido

Sonhei que estava caminhando na praia juntamente com Deus.

E revi, espelhado no céu, todos os dias da minha vida.

E em cada dia vivido, apareciam na areia, duas pegadas : as minhas e as d'Ele.

No entanto, de quando em quando, vi que havia apenas as minhas pegadas, e isso precisamente nos dias mais difíceis da minha vida.

Então perguntei a Deus:

"Senhor, eu quis seguir-Te, e Tu prometeste ficar sempre comigo.

Porque deixaste-me sozinho, logo nos momentos mais difíceis?

Ao que Ele respondeu:

"Meu filho, Eu te amo e nunca te abandonei. Os dias em que viste só um par de pegadas na areia são precisamente aqueles em que Eu te levei nos meus braços".

SUMÁRIO

<i>Lista de abreviaturas e símbolos</i>	i
<i>Lista de Tabelas</i>	ii
<i>Lista de Figuras</i>	iii
<i>Resumo</i>	
<i>Abstract</i>	
1. Introdução	1
1.1. Fármacos quirais	1
1.2. Resolução quiral	2
1.2.1. Fases estacionárias quirais derivadas de polissacarídeos	4
1.2.2. Fases protéicas	8
1.3. Preparação das amostras	10
1.3.1. Extração líquido-líquido	11
1.3.2. Extração em fase sólida	11
1.3.3. Microextração em fase sólida	12
1.3.4. Extração em membrana	12
1.4. Mirtazapina	21
1.4.1. Propriedades estereosseletivas	21
1.4.2. Análise enantiosseletiva	25
2. Objetivos	28
3. Materiais e Métodos	29
3.1. Materiais	29
3.1.1. Reagentes e solventes	29
3.1.2. Soluções-padrão	29
3.1.3. Amostras de plasma	30
3.1.4. Equipamentos	31
3.1.4.1. Sistema cromatográfico	31
3.1.4.2. Equipamentos empregados na preparação das fases móveis	31
3.1.4.3. Equipamentos empregados na preparação das amostras	32
3.1.5. Colunas com fases estacionárias quirais e coluna de guarda	33
3.2. Métodos	35
3.2.1. Avaliação das colunas cromatográficas quirais	35
3.2.2. Condições cromatográficas para análise enantiosseletiva da mirtazapina em plasma	37
3.2.3. Procedimento de preparação da amostra	37
3.2.3.1. Extração líquido-líquido	38

3.2.3.2. Microextração em fase líquida empregando fibras cilíndricas microporosas _____	39
3.3. Ordem de eluição dos enantiômeros da mirtazapina _____	42
3.4. Validação _____	42
3.4.1. Recuperação _____	43
3.4.2. Linearidade _____	43
3.4.3. Limite de quantificação _____	44
3.4.4. Precisão (repetibilidade) e exatidão _____	45
3.4.4.1. Precisão e exatidão intra-ensaio _____	45
3.4.4.2. Precisão e exatidão interensaios _____	46
3.4.5. Seletividade _____	46
3.4.6. Estudo de estabilidade _____	47
3.4.6.1. Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento _____	47
3.4.6.2. Estabilidade nas mesmas condições de tempo e análise _____	48
3.4.7. Estudo de racemização _____	48
3.5. Aplicação do método no estudo de disposição cinética _____	49
4. Resultados e discussão _____	50
4.1. Determinação do comprimento de onda para detecção _____	50
4.2. Avaliação das colunas quirais _____	51
4.2.1. Coluna Ultron-ES-OVM _____	52
4.2.2. Coluna Chiral AGP _____	52
4.2.3. Coluna Chiralpak AD-RH _____	53
4.2.4. Coluna Chiralcel OG _____	54
4.2.5. Coluna Chiralcel OJ _____	54
4.2.6. Coluna Chiralpak AD _____	55
4.2.7. Colunas Chiralcel OF, Chiralcel OD-H, Chiralcel OB-H e Chiralpak AS _____	56
4.3. Análise comparativa das colunas quirais _____	56
4.4. Otimização dos parâmetros de extração líquido-líquido _____	60
4.4.1. Solvente orgânico _____	60
4.4.2. Ajuste do pH da matriz _____	61
4.5. Otimização dos parâmetros de microextração em fase líquida _____	62
4.5.1. Fibra cilíndrica hidrofóbica _____	62
4.5.2. Solvente orgânico _____	63
4.5.3. Tempo de extração _____	64
4.5.4. Agitação da amostra _____	65
4.5.5. Razão volumétrica das fases aceptora e doadora _____	67
4.5.6. Diluição da amostra _____	69
4.5.7. Modificadores orgânicos _____	69
4.5.8. Ajuste de pH _____	71
4.5.9. Força iônica _____	73
4.5.10. Múltiplas extrações _____	73

4.5.11. Temperatura de extração _____	75
4.5.12. Condições otimizadas da LPME em plasma _____	77
4.6. Outros parâmetros otimizados _____	77
4.6.1. Procedimento de secagem da fase orgânica _____	77
4.6.2. Procedimento de lavagem do injetor _____	78
4.6.3. Procedimento de dissolução dos resíduos _____	78
4.7. Ordem de eluição dos enantiômeros da mirtazapina _____	79
4.8. Validação _____	80
4.8.1. Linearidade _____	81
4.8.2. Recuperação _____	83
4.8.3. Limite de quantificação _____	85
4.8.4. Precisão e exatidão _____	86
4.8.5. Seletividade _____	87
4.8.6. Estudo de estabilidade _____	90
4.8.7. Estudo de racemização _____	92
4.9. Aplicação do método no estudo de disposição cinética _____	93
5. Conclusões _____	97
6. Referências _____	99
7. Anexos _____	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α	Fator de separação
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUC	Área sob a curva
CE	Eletroforese capilar
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CD	Dicroísmo circular
CSP	Fase estacionária quiral
CV	Coeficiente de variação
CYP	Citocromo P-450
E	Erro relativo
EM	Metabolizador rápido
DEA	Dietilamina
F	Vazão da fase móvel (mL min^{-1})
FDA	Food and Drug Administration
FM	Fase móvel
GC	Cromatografia gasosa
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
I.D.	Diâmetro interno da coluna
K	Fator de retenção
K	Coeficiente de distribuição
LPME	Microextração em fase líquida
MMLLE	Extração líquido-líquido em membrana porosa
MRT	Mirtazapina
m/v	Massa/volume
N	Pratos teóricos
N	Número de amostras
N ₂	Gás Nitrogênio
ND	Não detectável pelo método cromatográfico em até 60 minutos
p.a.	Padrão analítico
PM	Metabolizador lento
<i>Rac</i> -mirtazapina	Mirtazapina racêmica
R	Recuperação
r ²	Coeficiente de determinação
R _s	Resolução
S	Estimativa de desvio padrão
SFC	Cromatografia com fluido supercrítico
SLM	Extração em membrana com suporte líquido
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida
t _M	Tempo de retenção de um composto não retido
t _R	Tempo de retenção do composto de interesse
UV	Luz ultra violeta
V _d	Volume da fase doadora
V _{org}	Volume da fase aceptora
v/v	Volume/volume
$\overline{X}$	Média das medidas em replicata
W _b	Largura da base do pico

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Disposição cinética e efeitos farmacológicos estereosseletivos de alguns fármacos quirais._____	2
Tabela 2.	Fases móveis avaliadas nas colunas Chiralcel OF, Chiralpak AS, Chiralcel OD-H e Chiralcel OB-H._____	57
Tabela 3.	Otimização das condições cromatográficas para a separação quiral da mirtazapina._____	59
Tabela 4.	Relação entre concentração de DEA na fase de dissolução dos resíduos e as áreas dos picos dos enantiômeros da mirtazapina._____	79
Tabela 5.	Recuperação média dos enantiômeros da mirtazapina em plasma empregando LLE._____	84
Tabela 6.	Recuperação média dos enantiômeros da mirtazapina em plasma empregando LPME._____	85
Tabela 7.	Precisão, exatidão e limite de quantificação para análise dos enantiômeros da mirtazapina em plasma empregando LLE._____	87
Tabela 8.	Precisão, exatidão e limite de quantificação para análise dos enantiômeros da mirtazapina em plasma empregando LPME._____	88
Tabela 9.	Avaliação da interferência de alguns fármacos na análise dos enantiômeros da mirtazapina empregando a LLE._____	89
Tabela 10.	Avaliação da interferência de alguns fármacos na análise dos enantiômeros da mirtazapina empregando a LPME._____	90
Tabela 11.	Estabilidade dos enantiômeros da mirtazapina em plasma após ciclos de congelamento e descongelamento e após estocagem à temperatura ambiente.____	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Modelo teórico dos três pontos de Dagliesh para explicar a resolução quiral pela diferença na interação entre os enantiômeros do analito (C) e a fase estacionária quiral (Eliel; Wilen, 1994)._____	4
Figura 2.	Estrutura de algumas fases estacionárias quirais derivadas de polissacarídeos.____	7
Figura 3.	Descrição esquemática da extração SLM para compostos básicos (B), Neutros (N) e Ácidos (HA) com o pH da fase doadora em valores elevados de modo a manter a base na forma molecular e permitir sua extração (Jönsson; Mathiasson, 2000)._____	16
Figura 4.	Descrição esquemática da MMLLE (Jönsson; Mathiasson, 2000)._____	16
Figura 5.	Esquema ilustrativo dos princípios básicos da LPME. (A) corresponde a amostra de interesse e (M) corresponde a matriz biológica._____	18
Figura 6.	Estrutura dos enantiômeros da mirtazapina (Dodd; Burrows; Norman, 2000).____	22
Figura 7.	Esquema da biotransformação da mirtazapina: 1 = 8-hidroxilação seguida de conjugação; 2 = N ⁺ -Glicuronidação; 3 = N-Oxidação; 4 = Desmetilação seguida por conjugação (Delbressine <i>et al.</i> , 1998)._____	23
Figura 8.	Estrutura dos enantiômeros da mefloquina (Souri; Farsam; Jamali, 1997)._____	30
Figura 9.	Procedimento de preparação das amostras de plasma humano empregando a LLE._____	40
Figura 10.	Foto ilustrativa demonstrando a simplicidade do sistema LPME._____	41
Figura 11.	Espectro de absorção na região do UV-Visível do composto <i>rac</i> -mirtazapina; solução preparada em metanol na concentração de 1 mg mL ⁻¹ . _____	50
Figura 12.	Separação dos enantiômeros da mirtazapina na coluna Ultron-ES-OVM._____	52
Figura 13.	Separação dos enantiômeros da mirtazapina na coluna Chiral AGP._____	53
Figura 14.	Separação dos enantiômeros da mirtazapina na coluna Chiralpak AD-RH._____	54
Figura 15.	Separação dos enantiômeros da mirtazapina na coluna Chiralcel OG._____	54
Figura 16.	Separação dos enantiômeros da mirtazapina na coluna Chiralcel OJ._____	55

- Figura 17.** Separação dos enantiômeros da mirtazapina na coluna Chiralpak AD. _____ 55
- Figura 18.** Cromatogramas referentes ao plasma branco (A); plasma fortificado com 12,5 ng mL⁻¹ de (+)-(S)-mirtazapina (1) e (-)-(R)-mirtazapina (2) (B); amostra de plasma de um paciente coletada 8 horas após administração oral de 30 mg do racemato (C). As análises foram realizadas empregando uma coluna Chiralpak AD e usando hexano:etanol (98:2, v/v) mais 0,1% de dietilamina na vazão de 1,2 mL min⁻¹, λ = 292 nm; amostras tratadas por LLE. _____ 61
- Figura 19.** Foto ilustrativa demonstrando as reais dimensões de uma fibra cilíndrica microporosa de polipropileno com 7,0 cm de comprimento e empregada na LPME (indicada por uma seta). _____ 63
- Figura 20.** Cromatogramas referentes ao plasma branco (A); plasma fortificado com 62,5 ng mL⁻¹ de (+)-(S)-mirtazapina (2) e (-)-(R)-mirtazapina (3) e 500 ng mL⁻¹ de (S, R)-mefloquina (1,4) (B); amostra de plasma de um voluntário coletada 2 horas após administração oral de 30 mg do racemato (C). As análises foram realizadas empregando uma coluna Chiralpak AD e usando hexano:etanol (98:2, v/v) mais 0,1% de dietilamina na vazão de 1,2 mL min⁻¹, λ = 292 nm; amostras tratadas por LPME. _____ 65
- Figura 21.** Efeito do tempo de extração na recuperação de 250 ng mL⁻¹ de cada enantiômero da mirtazapina. Condições de extração: 25 °C; 7 cm de fibra; 1 mL de plasma, 100 µL de NaOH 10 mol L⁻¹ e 3,0 mL de água MILLI-Q-PLUS® (Fase doadora); 22 µL de tolueno (Fase aceptora). As condições cromatográficas são apresentadas na seção 3.2.2. (n = 3 para cada experimento). _____ 66
- Figura 22.** Efeito do comprimento da fibra na recuperação de 250 ng mL⁻¹ de cada enantiômero da mirtazapina. Condições de extração: 25 °C; 30 min; 1 mL de plasma, 100 µL de NaOH 10 mol L⁻¹ e 3,0 mL de água MILLI-Q-PLUS® (Fase doadora); tolueno (Fase aceptora). As condições cromatográficas são apresentadas na seção 3.2.2. (n = 3 para cada experimento). _____ 68
- Figura 23.** Efeito de diferentes volumes de plasma na recuperação de 250 ng mL⁻¹ de cada enantiômero da mirtazapina. Condições de extração: 25 °C; 30 min; 7 cm de membrana; 150 µL de NaOH 10 mol L⁻¹ e água MILLI-Q-PLUS® até 4mL (Fase doadora); 22 µL de tolueno (Fase aceptora). As condições cromatográficas são apresentadas na seção 3.2.2.. (n = 3 para cada experimento). _____ 70

- Figura 24.** Efeito da adição de metanol na recuperação de 250 ng mL⁻¹ de cada enantiômero da mirtazapina. Condições de extração: 25 °C; 30 min; 7 cm de membrana; 700 µL de plasma, 150 µL de NaOH 10 mol L⁻¹ e água MILLI-Q-PLUS® até 4 mL (Fase doadora); 22 µL de tolueno (Fase aceptora). As condições cromatográficas são apresentadas na seção 3.2.2.. (n = 3 para cada experimento)._____ 71
- Figura 25.** Efeito do pH da fase doadora na recuperação de 250 ng mL⁻¹ de cada enantiômero da mirtazapina. Condições de extração: 25 °C; 30 min; 7 cm de fibra; 700 µL de plasma e 3,1 mL de água MILLI-Q-PLUS® ou tampão fosfato (Fase doadora); 22 µL de tolueno (Fase aceptora). As condições cromatográficas são apresentadas na seção 3.2.2. (n = 3 para cada experimento). 72
- Figura 26.** Efeito da adição de diferentes volumes de NaOH 10 mol L⁻¹ na recuperação de 250 ng mL⁻¹ de cada enantiômero da mirtazapina. Condições de extração: 25 °C; 30 min; 7 cm de fibra; 700 µL de plasma e 3,1 mL de água MILLI-Q-PLUS® (Fase doadora); 22 µL de tolueno (Fase aceptora). As condições cromatográficas são apresentadas na seção 3.2.2. (n = 3 para cada experimento). 72
- Figura 27.** Efeito da adição de cloreto de sódio na recuperação de 250 ng mL⁻¹ de cada enantiômero da mirtazapina. Condições de extração: 25 °C; 30 min; 7 cm de membrana; 700 µL de plasma, 150 µL de NaOH 10 mol L⁻¹ e 3,1 mL de água MILLI-Q-PLUS® (Fase doadora); 22 µL de tolueno (Fase aceptora). As condições cromatográficas são apresentadas na seção 3.2.2.. (n = 3 para cada experimento)._____ 74
- Figura 28.** Perfil de múltiplas extrações na recuperação de 250 ng mL⁻¹ de cada enantiômero da mirtazapina. Condições de extração: 25 °C; 7 cm de membrana; 700 µL de plasma, 150 µL de NaOH 10 mol L⁻¹ e 3,1 mL de água MILLI-Q-PLUS® (Fase doadora); 22 µL de tolueno (Fase aceptora). As condições cromatográficas são apresentadas na seção 3.2.2.. (n = para cada experimento)._____ 75
- Figura 29.** Efeito da temperatura na recuperação de 250 ng mL⁻¹ de cada enantiômero da mirtazapina. Condições de extração: 30 min; 7 cm de membrana; 700 µL de plasma, 150 µL de NaOH 10 mol L⁻¹ e 3,1 mL de água MILLI-Q-PLUS® (Fase doadora); 22 µL de tolueno (Fase aceptora). As condições cromatográficas são apresentadas na seção 3.2.2.. (n = 3 para cada experimento)._____ 76
- Figura 30.** Cromatograma referente a análise da *rac*-mirtazapina empregando detecção CD para detecção em 250 nm e espectro de CD da (+)-(S)-mirtazapina e (-)-(R)-mirtazapina. As condições cromatográficas são apresentados na seção 3.2.2..____ 80
- Figura 31.** Curvas analíticas mostrando a linearidade do método de análise dos enantiômeros da mirtazapina, no intervalo de concentração plasmática de 5,0 a 625 ng de cada enantiômero mL⁻¹. As amostras foram tratadas empregando a

	LLE.	82
Figura 32.	Curvas analíticas mostrando a linearidade do método de análise dos enantiômeros da mirtazapina, no intervalo de concentração plasmática de 6,25 a 625 ng de cada enantiômero mL ⁻¹ . As amostras foram tratadas empregando a LPME.	83
Figura 33.	Cromatogramas referentes ao estudo de racemização. (A) corresponde a soluções-padrão dos enantiômeros puros da mirtazapina e (B) corresponde a amostras dos enantiômeros puros da mirtazapina em plasma fortificado. (1) representa o enantiômero (+)-(S)-mirtazapina e (2) o enantiômero (-)-(R)-mirtazapina. As análises foram realizadas empregando uma coluna Chiralpak AD, usando hexano:etanol (98:2, v/v) mais 0,1% de dietilamina na vazão de 1,5 mL min ⁻¹ , λ = 292 nm; amostras tratadas por LPME.	93
Figura 34.	Curvas analíticas no intervalo de concentração plasmática de 6,25 a 125 ng mL ⁻¹ mostrando o perfil de concentração plasmática dos enantiômeros da mirtazapina 8 horas após a administração oral do fármaco racêmico na concentração de 30 mg mL ⁻¹ a um paciente [(+)-(S)- = 21,3 ng mL ⁻¹ ; (-)-(R)- = 23,6 ng mL ⁻¹]. As amostras foram tratadas por LLE.	94
Figura 35.	Perfil concentração plasmática dos enantiômeros da mirtazapina <i>versus</i> tempo de administração oral do fármaco racêmico.	95
Figura 36.	Curvas analíticas no intervalo de concentração plasmática de 6,25 a 125 ng mL ⁻¹ demonstrando o perfil de concentração plasmática dos enantiômeros da mirtazapina 2 horas após a administração oral do fármaco racêmico na concentração de 30 mg mL ⁻¹ por um voluntário sadio [(+)-(S)- = 18,1 ng mL ⁻¹ ; (-)-(R)- = 12,2 ng mL ⁻¹]. As amostras foram tratadas por LPME.	96

ABSTRACT

ABSTRACT

The increased interest in enantioselective pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of chiral drugs, aiming to establish the advantages in the production of estereochemically pure drugs, has led to the development of methods of analysis with low limits of quantification, selectivity and reproducibility, which are suitable to be used in kinetic disposition studies.

On this basis, mirtazapine, a new antidepressant with estereoselective pharmacokinetic and pharmacodynamic properties but with few suitable methodologies for the separation and quantification of its enantiomers, was selected to evaluate two techniques of sample preparation. The procedure involved a classic liquid-liquid extraction and a new technique of liquid-phase microextraction using microporous polypropylene hollow fiber, both using toluene as extraction solvent. The analyses were carried out by high-performance liquid chromatography using chiral stationary phase and UV detection, at 292 nm. The chromatographic separation of (+)-(S)- e (-)-(R)-mirtazapine was performed on a Chiralpak AD column protected by a CN guard column, using hexane:ethanol (98:2, v/v) + 0.1% diethylamine as mobile phase. The mean recovery of mirtazapine enantiomers using LLE (96%) was higher than LPME (29%); in spite of this, the quantification limits have been very close, i.e, 5.0 ng mL⁻¹ for LLE and 6.25 ng mL⁻¹ for LPME. In precision and accuracy studies, coefficients of variation and relative errors were below 15% for all the evaluated samples in both LLE and LPME techniques. The microextraction method based on LPME proved to be more economic and less pollutant than LLE and as fast, sensible and reproducible as LLE. The two techniques of sample preparation have proved to be suitable for their application in kinetic disposition studies.

RESUMO

RESUMO

O crescente interesse na avaliação da estereosseletividade na farmacocinética e farmacodinâmica de fármacos quirais, visando estabelecer as vantagens na produção de fármacos estereoquimicamente puros, tem levado ao desenvolvimento de métodos de análises com baixos limites de quantificação, seletividade e reprodutibilidade compatíveis com sua utilização em estudos de disposição cinética.

Nesse contexto, um método empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi desenvolvido para a análise enantiosseletiva da mirtazapina em plasma humano. A mirtazapina foi selecionada para esse estudo por ser um novo antidepressivo, com propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas estereosseletivas e em razão da carência de metodologia adequada para a quantificação individual dos seus enantiômeros. O procedimento de preparação das amostras envolveu tanto a extração líquido-líquido (LLE) quanto uma nova técnica de microextração em fase líquida empregando fibra cilíndrica microporosa de polipropileno (LPME), ambas usando tolueno como solvente de extração, seguido de análise cromatográfica, com detecção por absorção no UV, em 292 nm. A separação cromatográfica das formas (+)-(S)- e (-)-(R)-mirtazapina foi obtida em uma coluna Chiralpak AD protegida por coluna de guarda CN, usando hexano:etanol (98:2, v/v) + 0,1% de dietilamina como fase móvel. A recuperação média dos enantiômeros da mirtazapina empregando a LLE (96%) foi superior à obtida com a LPME (29%); apesar disso, os limites de quantificação foram muito próximos, isto é, 5,0 ng mL⁻¹ para a LLE e 6,25 ng mL⁻¹ para a LPME. Nos estudos de precisão e exatidão, os coeficientes de variação e erros relativos foram inferiores a 15% para todas as amostras avaliadas, empregando ambas as técnicas. O método de microextração baseado na LPME provou ser mais econômico e menos poluente e tão rápido, sensível e reprodutível quanto a LLE. As duas técnicas de preparação de amostras provaram ser adequadas e compatíveis para suas aplicações em estudos de disposição cinética.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fármacos quirais

Uma vez que as macromoléculas biológicas são quirais e muitas reações são catalisadas por enzimas opticamente ativas, esse ambiente biológico quiral é capaz de discriminar substâncias exógenas também quirais. Se essas substâncias exógenas forem fármacos, as interações estereoespecíficas podem resultar em propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas distintas para cada um dos enantiômeros (Tucker; Lennard, 1990).

Conforme exemplificado na Tabela 1, um dos enantiômeros do fármaco pode ser absorvido, metabolizado, distribuído ou eliminado diferentemente da outra forma enantiomérica. Os enantiômeros podem também sofrer inversão quiral ou racemização no organismo (Caldwell, 1996; Maier; Franco; Lindner, 2001; Anová; Hutta, 2003). Aliado a isso, os dois enantiômeros podem apresentar efeitos terapêuticos ou tóxicos distintos.

Em função dessas diferenças, existe um interesse cada vez mais acentuado no desenvolvimento de novos procedimentos para separar os enantiômeros dos fármacos comercializados como misturas racêmicas e estudar a farmacocinética e farmacodinâmica de cada enantiômero, para adequá-los as novas exigências das autoridades reguladoras e de saúde (Food and Drug Administration, FDA, 1992, por exemplo) (Caldwell, 1995).

Tabela 1. Disposição cinética e efeitos farmacológicos estereosseletivos de alguns fármacos quirais.

Fármaco quiral	Disposição cinética e efeito farmacológico dos enantiômeros
Morfina (analgésico)	O enantiômero (-)-(R)- é o único com atividade analgésica.
Propranolol (antiarrítmico)	A forma enantiomérica (+)-(S)- é 100 vezes mais potente que a (-)-(R)- e apresenta tempo de meia vida mais longo.
Ácido 1-metil-5-fenil-5-propilbarbitúrico (sedativo)	Atividades opostas no sistema nervoso central. Um enantiômero apresenta o efeito sedativo desejado (hipnótico ou narcótico dependendo da dose) e o outro é um convulsivante.
Ácido 2-bromofenoxipropiônico (agente do crescimento)	Uma ação antagonista é evidenciada pela forma (-)-(R)- enquanto o enantiômero (+)-(S)- é um estimulante do crescimento.
Ibuprofeno (agente antiinflamatório)	Este fármaco é administrado como racemato pois o enantiômero inativo (-)-(R)- sofre inversão quiral para o enantiômero ativo (+)-(S)- no organismo.

1.2. Resolução quiral

Embora a separação enantiosseletiva possa ser alcançada empregando outros métodos (cristalização, por exemplo), ela é mais facilmente realizada por meio de técnicas cromatográficas e eletroforese capilar (Eliel; Wilen, 1994). A cromatografia quiral inclui o uso de cromatografia gasosa (gas chromatography, GC), cromatografia com fluido supercrítico (supercritical fluid chromatography, SFC) e cromatografia líquida de alta eficiência (high-performance liquid chromatography, HPLC) (Snyder; Kirkland; Glajch, 1997).

Nas últimas três décadas, a resolução quiral por HPLC tem progredido rapidamente e vem se tornando um método prático e útil, sendo, atualmente, o mais largamente usado

não somente para a determinação da pureza enantiomérica e análise em fluidos biológicos, mas também, para a obtenção dos isômeros puros (Snyder; Kirkland; Glajch, 1997).

Embora a derivação quirál tenha sido largamente utilizada entre 1970 e 1980, como uma técnica indireta de separação por HPLC, atualmente ela foi praticamente substituída pelo uso de fases estacionárias quirais (chiral stationary phase, CSP), que constituem um método direto, simples e prático, aplicável tanto para separações preparativas quanto para a determinação de isômeros ópticos, sem o risco de ocorrer racemização durante a reação com o agente de derivação. Outro método direto é a separação em fases estacionárias não quirais através da adição de um agente quirál na fase móvel. Entretanto, esta não é atualmente uma técnica muito difundida, em razão dos custos elevados das análises (Allinger *et al.*, 1976; Haginaka, 2002).

Desde o início do desenvolvimento da cromatografia quirál, centenas de novas fases estacionárias quirais foram propostas por vários grupos de pesquisadores, e algumas delas são disponíveis comercialmente (Okamoto; Kaida, 1994; Allenmark; Andersson, 1994; Yashima; Okamoto, 1995; Oguni; Oda; Ichida, 1995; entre outros). Esses grupos propõem o uso de seletores quirais naturais como as proteínas e enzimas, oligossacarídeos, antibióticos macrocíclicos; seletores quirais semisintéticos como os oligossacarídeos e polissacarídeos modificados; e seletores quirais sintéticos como os seletores tipo Pirkle, éter de coroa, derivados prolina e polímeros helicoidais sintéticos (Eliel; Wilen, 1994).

A natureza da separação pelo método direto empregando CSP depende da habilidade do analito e da CSP em formar complexos diastereoisoméricos transitórios, com afinidades enantiosseletivas diferentes, através de ligações de hidrogênio, interações π - π , dipolo-dipolo, interações eletrostáticas, complexos de inclusão e impedimento estereo.

Embora muito debatido, vários autores ainda sugerem que esse reconhecimento quiral requer que um dos enantiômeros apresente um mínimo de três interações simultâneas, com pelo menos uma sendo estereoquimicamente dependente (modelo de separação quiral baseado na interação dos três pontos (Dalglish, 1952)) (Eliel; Wilen, 1994); este modelo se encontra esquematizado na Figura 1. Dessa forma, a força de ligação de um dos enantiômeros será maior que a do outro, resultando em diferentes tempos de retenção do par enantiomérico, dependendo da diferença na estabilidade desses complexos formados.

Figura 1. Modelo teórico dos três pontos de Dalglish para explicar a resolução quiral pela diferença na interação entre os enantiômeros do analito (C) e a fase estacionária quiral (Eliel; Wilen, 1994).

1.2.1. Fases estacionárias quirais derivadas de polissacarídeos

Os polissacarídeos estão entre os mais importantes e abundantes biopolímeros naturais com atividade óptica, apresentando uma unidade de D-glicose, que se repete regularmente (Okamoto; Yashima, 1998). A primeira aplicação de carboidratos na cromatografia quiral foi realizada por Hesse e Hagel (1976), os quais mostraram que o triacetato de celulose microcristalina (microcrystalline cellulose triacetate, MCT) tinha boa habilidade de resolução quiral, embora a qualidade dessas separações não seja suficiente para os requisitos analíticos atuais. Além disso, eles acreditavam que a habilidade de

reconhecimento quiral poderia ser perdida quando o MCT era dissolvido em um solvente orgânico.

Alguns anos mais tarde, Namikoshi *et al.*, (1987) e Okamoto *et al.*, (1984) reexaminando a relação entre a morfologia do MCT e a habilidade de reconhecimento quiral propuseram o desenvolvimento de um novo tipo de CSP, que consistia de derivados de celulose ou amilose (acetatos, benzoatos ou carbamatos) incorporados à um suporte sólido (sílica-gel, por exemplo) pré-tratado. Eles demonstraram que a seletividade quiral não era perdida pela dissolução dos polissacarídeos em solventes orgânicos e que essa habilidade de discriminação dependia do tipo de substituínte do grupamento hidroxila, de como os polissacarídeos eram incorporados à matriz e da estrutura da celulose e/ou amilose (Okamoto; Yashima, 1998; Yashima, 2001).

Assim sendo, as fases estacionárias baseadas nesses polissacarídeos estão entre as mais amplamente utilizadas em separações cromatográficas quirais. A preferência por essas fases estacionárias deve-se à sua comprovada estabilidade, eficiência, durabilidade, versatilidade e elevada habilidade de resolução. As fases baseadas em derivados de polissacarídeos são adequadas para separações enantioméricas em escala analítica e preparativa (Okamoto; Kaida, 1994). O principal sítio de adsorção quiral nos derivados acetato e benzoato é o grupo polar carbonila, que pode interagir com os grupos funcionais dos fármacos quirais através de ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo. Nos derivados de carbamato, o soluto pode interagir com os grupos C=O e NH através de ligações de hidrogênio e com o grupamento C=O através de interações dipolo-dipolo (Okamoto; Yashima, 1998).

A Figura 2 apresenta as estruturas de alguns derivados de polissacarídeos largamente utilizados em análises de fármacos. Inicialmente, as CSP derivadas de

polissacarídeos eram amplamente empregadas no modo fase normal com misturas de hexano/iso-propanol ou hexano/etanol como fases móveis. O uso desses solventes foi possível graças a inexistência de grupamento funcional carregado nessas fases; interações relativamente fracas como ligações de hidrogênio, interações π - π e dipolo-dipolo são consideradas as mais efetivas sob essas condições. Em contraste, com o sucesso dessas fases empregadas no modo normal, existe significativamente poucos relatos de separações de enantiômeros usando CSP baseadas em polissacarídeos com fases móveis aquosas (água/álcoois ou água/acetonitrila), mesmo com as numerosas vantagens em se utilizar condições de fase reversa, tais como: boa solubilidade dos compostos polares, facilidade na preparações de amostras de plasma ou soro e uso de uma menor quantidade de solventes orgânicos. Condições de fase reversa têm sido especialmente usadas para a avaliação da razão enantiomérica de um fármaco em matrizes biológicas (Tachibana; Ohnishi, 2001).

Além desses, também existe o modo de eluição polar orgânico que emprega unicamente solventes orgânicos polares (acetonitrila, metanol, etanol, iso-propanol e suas misturas). Esses eluentes orgânicos são extremamente úteis para separações em escala preparativa por apresentarem elevada solubilidade para analitos polares e simplicidade relativa na evaporação (Tachibana; Ohnishi, 2001).

<i>NOME COMERCIAL</i>	<i>SELETOR QUIRAL</i>
<i>Derivados de éster de celulose</i>	
CHIRALCEL OJ	<p>Celulose tris(4-metilbenzoato) recobrindo um suporte de sílica-gel de 10 µm</p> $R: -C(=O)-C_6H_4-CH_3$
CHIRALCEL OB-H	<p>Celulose tribenzoato recobrindo um suporte de sílica-gel de 5 µm</p> $R: -C(=O)-C_6H_5$
<i>Derivados de carbamato de celulose</i>	
CHIRALCEL OD-H	<p>Celulose tris(3,5-dimetilfenil carbamato) recobrindo um suporte de sílica-gel de 5 µm</p> $R: -C(=O)-NH-C_6H_3(CH_3)_2$
CHIRALCEL OG	<p>Celulose tris(4-metilfenil carbamato) recobrindo um suporte de sílica-gel de 10 µm</p> $R: -C(=O)-NH-C_6H_4-CH_3$
CHIRALCEL OF	<p>Celulose tris(4-clorofenil carbamato) recobrindo um suporte de sílica-gel de 10 µm</p> $R: -C(=O)-NH-C_6H_4-Cl$
<i>Derivados de carbamato de amilose</i>	
CHIRALPAK AD	<p>Celulose tris(4-dimetilfenil carbamato) recobrindo um suporte de sílica-gel de 10 µm</p> $R: -C(=O)-NH-C_6H_3(CH_3)_2$
CHIRALPAK AS	<p>Amilose tris [(S)-α-metilbenzil carbamato] recobrindo um suporte de sílica-gel de 10 µm</p> $R: -C(=O)-NH-CH(CH_3)-C_6H_5$
<i>Derivados de carbamato de amilose</i>	
CHIRALPAK AD - RH	<p>Amilose tris(3,5-dimetilfenil carbamato) recobrindo um suporte de sílica-gel de 5 µm</p> $R: -C(=O)-NH-C_6H_3(CH_3)_2$

Figura 2. Estrutura de algumas fases estacionárias quirais derivadas de polissacarídeos.

* essas fases podem ser usadas também no modo polar orgânico.

Durante as separações nos modos fase reversa e polar orgânico, os analitos carregados não interagem suficientemente com a CSP, presumivelmente devido à sua solvatação e inibição direta das interação entre os analitos e a CSP, resultando, eventualmente, em separações incompletas. Como não existe grupamento funcional nos polissacarídeos que seja de natureza iônica para interagir com o analito carregado, o controle da carga do analito através da supressão da sua ionização ou pela formação de pares iônicos com um contra íon adequado (já que os pares iônicos, por si só, podem ser considerados neutros) é fundamental para alcançar uma boa separação (Tachibana; Ohnishi, 2001).

1.2.2. Fases protéicas

Em 1973, pela primeira vez, Stewart e Doherty demonstraram que os enantiômeros do D,L-triptofano poderiam ser resolvidos por cromatografia líquida usando albumina de soro bovino em um suporte de agarose. Desde então, devido a sua elevada enantiosseletividade, larga aplicabilidade, análise direta sem derivação, elevada seletividade e conhecida compatibilidade das soluções tampão aquosas, normalmente usadas como fases móveis, com os fluidos biológicos, as colunas baseadas em proteínas têm sido largamente empregadas para a análise rotineira de fármacos quirais em escala analítica por HPLC e, mais recentemente, por eletroforese capilar (Haginaka, 2001, Millot, 2003). Por outro lado, essas fases estacionárias são menos adequadas para aplicações preparativas devido a sua limitada capacidade e custo relativamente alto. As CSP protéicas apresentam grupamentos funcionais em suas molécula que, sob condições de fase reversa, permitem interações iônicas e hidrofóbicas entre as CSP e os analitos, normalmente

resultando em elevada seletividade para os diferentes enantiômeros de um racemato. Em particular muitos racematos, que são difíceis de serem separados em outras fases, têm sido facilmente resolvidos com uma única coluna de fase protéica. Fases estacionárias comercialmente disponíveis têm sido preparadas com albumina de soro bovino e humano, celobiohidrolase, α_1 -glicoproteína ácida humana e proteína ovomucóide. Entre essas, as colunas baseadas em α_1 -glicoproteína ácida (Chiral AGP) e proteína ovomucóide (Ultron ES-OVM) têm apresentado uma vasta aplicabilidade (Gyimesi-Forrás *et al.*, 1999; Haginaka; Kagawa; Matsunaga, 1999).

A resolução das formas enantioméricas nas CSP baseadas em proteínas é fortemente influenciada pelas condições cromatográficas como: tipo e concentração dos modificadores orgânicos; pH e aditivos na fase móvel e temperatura, e por algumas características do material de suporte como suas propriedades físicas e o método de ligação usado. A sílica-gel tem sido preferencialmente usada como suporte (Gyimesi-Forrás *et al.*, 1999; Haginaka, 2001).

O mecanismo pelo qual as proteínas podem interagir estereosseletivamente com os racematos é complexo e não muito bem conhecido. Proteínas diferentes podem exibir significativas diferenças na sua seletividade frente a compostos com estruturas variadas. As principais interações entre proteínas e enantiômeros são as ligações hidrofóbicas e as interações eletrostáticas, entretanto, ligações de hidrogênio e interações de transferência de carga também podem contribuir para a seletividade quiral. Aliado a isso, diferentes sítios na proteína e inclusões na estrutura tridimensional dessas macromoléculas provavelmente estão envolvidos na seletividade dessas interações (Snyder; Kirkland; Glajch, 1997).

1.3. Preparação das amostras

A análise de fármacos em fluidos biológicos normalmente é complicada pelas baixas concentrações do analito (0,1-10 ng mL⁻¹), pela complexidade das matrizes biológicas e pelo limitado volume das amostras disponíveis para a determinação (normalmente 0,5-1 mL) (Rasmussen *et al.*, 2000). A elevada concentração de proteínas e o grande número de compostos endógenos presentes nesse tipo de matriz também dificultam a análise e podem levar à precipitação ou desnaturação e adsorção no material de recheio da coluna, com conseqüente aumento da pressão do sistema, mudanças no tempo de retenção e decréscimo na capacidade e eficiência da coluna quiral (Anová; Hutta, 2003). Devido a isso, apesar do surgimento de técnicas modernas de separação, com as quais se pode obter alta seletividade e baixos limites de detecção/quantificação, a preparação da amostra é a primeira e mais crucial etapa na análise dos fármacos e inclui pré-concentração do analito e “clean up” da amostra (Queiroz; Collins; Jardim, 2001).

Em geral, mais de um tipo de técnica de extração e/ou concentração pode ser empregado para uma certa amostra. A escolha da técnica a ser utilizada deve levar em conta as seguintes características: i) ser simples; ii) ser rápida; iii) ter baixo custo; iv) fornecer extratos relativamente livres de interferentes; v) ter alta recuperação, com boa exatidão e precisão para os analitos de interesse (Queiroz; Collins; Jardim, 2001).

A preparação das amostras é, tradicionalmente, realizada pelas técnicas de extração líquido-líquido e extração em fase sólida; mais recentemente, a microextração em fase sólida e extração com membranas têm se mostrado técnicas alternativas promissoras (Gilar; Bouvier; Compton, 2001).

1.3.1. Extração líquido-líquido

Uma das técnicas mais versáteis de extração para o enriquecimento de analitos de amostras líquidas, como por exemplo fluidos biológicos, é a extração líquido-líquido (liquid-liquid extraction, LLE), pois extratos bastante limpos podem ser obtidos pela partição do analito entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa) (Mcdowall, 1989). A LLE oferece um poder elevado de extração do analito, quimicamente regulado, através da seleção do solvente extrator, ajuste de pH e incorporação de diferentes reagentes específicos, puros e disponíveis comercialmente. Entretanto, a LLE também implica no elevado consumo de solventes orgânicos, dificuldade de automação e/ou a conexão “on-line” com os instrumentos analíticos e dificuldades experimentais como a formação, freqüente, de emulsões (Jönsson; Mathiasson, 1999; Jönsson, *et al.*, 2000).

1.3.2. Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (solid phase extraction, SPE) emprega sorventes recheados em cartuchos ou adsorvidos em discos e os mecanismos de retenção são idênticos aqueles envolvidos em cromatografia líquida em coluna. Essa técnica é bem compatível com HPLC de fase reversa e é de fácil automação. Entretanto, apresenta retenção insuficiente de muitos compostos polares, seletividade limitada e elevado custo operacional. Além disso, a quantidade de solventes orgânicos necessários para a SPE ainda é significativa, mesmo que seja menor que a usada em LLE (Jönsson; Mathiasson, 2000; Queiroz; Collins; Jardim, 2001).

1.3.3. Microextração em fase sólida

Uma outra técnica de extração, recentemente introduzida, é a microextração em fase sólida (SPME, solid phase microextraction) que emprega uma fibra ótica de sílica fundida recoberta com um filme fino de um polímero ou de um adsorvente sólido. Esta fibra ótica, junto com a fase extratora, é acondicionada dentro da agulha de uma microseringa. Para a extração dos analitos, a fibra é colocada em contato direto com a amostra ou na fase vapor de um frasco de “headspace” (solutos voláteis); após a extração, os analitos presentes na fibra são dessorvidos e introduzidos na instrumentação analítica requerida (HPLC ou GC). É um método mais simples e mais rápido que a LLE e a SPE, em geral são obtidos extratos mais limpos e quase não se emprega solventes orgânicos para a dessorção. No entanto, apresenta como desvantagens valores bastante reduzidos de recuperação, o que é indesejável quando se deseja quantificar analitos a nível de traços (Gilar; Bouvier; Compton, 2001; Valente; Augusto, 2000; Queiroz; Collins; Jardim, 2001).

1.3.4. Extração em membrana

Uma das mais recentes tendências na busca por novas técnicas de preparação de amostras é a miniaturização do método tradicional de LLE com o objetivo de um aumento na razão volumétrica entre a fase aquosa, chamada de doadora e a fase orgânica, denominada aceptora. Isto pode ser alcançado usando tanto fases líquidas imiscíveis (microextração com solvente) quanto membranas separando as fases aceptora-doadora (extração em membrana).

A principal metodologia envolvida na microextração com solventes foi introduzida em 1996 por Jeannot e Cantwell e recebeu a denominação de SDME (single drop

microextraction). Nessa técnica, uma gota de solvente orgânico imiscível em água é mantida suspensa na ponta da agulha de uma microseringa que está imersa na amostra aquosa; os analitos presentes na fase aquosa são extraídos para a microgota de solvente orgânico que, subseqüentemente, é retraída para o interior da microseringa e transferida para um instrumento analítico. A SDME pode ainda ser empregada como um sistema de três fases, no qual os analitos são transferidos da fase aquosa através da microgota de solvente orgânico até a fase aceptora, também aquosa, e contida no interior da microseringa (Psillakis; Kalogerakis, 2003; Rasmussen; Pedersen-Bjerggard, 2004). De modo geral, as técnicas de microextração em solvente provaram ser rápidas, eficientes e de baixo custo, praticamente eliminando o uso de solventes tóxicos (Ma; Cantwell, 1999; Psillakis, Kalogerakis, 2003). Entretanto, elas não são muito robustas, já que a gota pode ser desfeita durante a extração, especialmente quando as amostras são submetidas a agitação vigorosa para acelerar o processo de transferência dos analitos entre as duas fases. Além disso, as amostras biológicas poderiam emulsificar substancialmente os solventes orgânicos e isto poderia afetar a estabilidade da gota suspensa (Psillakis; Kalogerakis, 2003; Rasmussen; Pedersen-Bjerggard, 2004).

A outra versão da LLE miniaturizada, ou seja, a extração em membrana, pode ser dividida em duas principais categorias:

- *Técnicas em membranas porosas*, nas quais as soluções dos dois lados da membrana estão em contato direto através dos poros de uma membrana; e,
- *Técnicas em membrana não porosa*, nas quais a membrana forma uma outra fase (polimérica ou líquida) entre as soluções doadora e aceptora.

As várias técnicas em membrana porosa (Donnan diálise, microdiálises, técnicas de micro e nanofiltração, por exemplo) têm sido largamente empregadas na separação de

analitos com pequena massa molecular e os componentes da matriz, com elevada massa molecular, levando a um eficiente “clean-up”. Entretanto, estes métodos não discriminam moléculas pequenas diferentes. Dessa forma, embora algumas variações desse processo (ASTED, por exemplo) estejam sendo utilizadas para a análise de fármacos em matrizes biológicas com considerável “clean-up” e enriquecimento, essa técnica não é muito utilizada na preparação de amostras em HPLC (Jönsson; Mathiasson, 2000).

Por outro lado, ao longo dos anos, diversas técnicas de extração baseadas em membranas não porosas têm sido usadas. Na técnica que será empregada nesse estudo, uma membrana hidrofóbica não porosa forma uma barreira seletiva entre as fases doadora e aceptora. A separação é obtida devido à capacidade da membrana em transportar alguns componentes da fase doadora para a fase aceptora, mais rapidamente que outros (Jönsson; Mathiasson, 1999; Cordeiro, *et al.*, 2000).

Existem três principais modos de extração através de membranas poliméricas hidrofóbicas (planas e/ou cilíndricas): a SLM (supported liquid membrane extraction), a MMLLE (microporos membrane liquid-liquid extraction) e a LPME (liquid phase microextraction) (Merbel, 1999; Pedersen-Bjergaard; Rasmussen 2000).

Uma das técnicas mais emergentes de extração em membrana não porosa é a SLM, na qual um solvente orgânico é mantido através de forças capilares nos poros de uma membrana polimérica hidrofóbica e plana que atua como suporte. Nesse contexto, solventes tipicamente usados são hidrocarbonetos de cadeia longa, como o n-undecano e compostos mais polares como o éter diexil ou fosfato dioctil. Além disso, vários aditivos podem ser adicionados na fase orgânica, moléculas carreadoras ou íons complexos, por exemplo, os quais podem aumentar consideravelmente a eficiência da extração e melhorar sua

seletividade e a transferência de massas, além de permitir a extração de várias espécies carregadas (Merbel, 1999; Jönsson; Mathiasson, 2000).

A Figura 3 esquematiza a extração de compostos básicos usando um sistema SLM. Nesse caso, a fase doadora é alcalinizada para manter o fármaco na forma não protonada, facilitando sua dissolução no solvente orgânico contido na membrana hidrofóbica. A fase aceptora é acidificada para que o fármaco torne-se protonado e não haja tendência de sua volta para o solvente retido na membrana. Compostos de alta massa molar serão retidos na fase doadora por não poderem atravessar os poros da membrana hidrofóbica. Compostos ácidos estarão carregados negativamente e não serão solubilizados pelo solvente retido na membrana. Compostos neutros serão transportados para a fase aceptora, mas não serão concentrados. Nessas condições, a extração SLM será altamente seletiva para compostos pequenos e básicos. Quimicamente é similar a LLE em um solvente orgânico, seguido de uma extração de volta em uma segunda fase aquosa. Compostos ácidos poderão ser extraídos acidificando a fase doadora e alcalinizando a fase aceptora (Jönsson; Mathiasson, 2000).

Após a etapa de extração, a fase aceptora é transferida para um instrumento analítico, manualmente ou “on-line” por um sistema de fluxo. Como a fase aceptora é aquosa, essa técnica é mais compatível com a cromatografia líquida em fase reversa ou cromatografia por troca iônica (Jönsson; Mathiasson, 2000).

A Figura 4 descreve o mecanismo de extração empregado na técnica MMLLE; nessa técnica de extração em membrana não porosa, a fase aceptora é um solvente orgânico e o mesmo solvente é o líquido que preenche os poros da membrana polimérica hidrofóbica plana e porosa. A MMLLE é mais adequada que a SLM para compostos altamente hidrofóbicos.

Figura 3. Descrição esquemática da extração SLM para compostos básicos (B), Neutros (N) e Ácidos (HA) com o pH da fase doadora em valores elevados de modo a manter a base na forma molecular e permitir sua extração (Jönsson; Mathiasson, 2000).

Estes compostos são facilmente extraídos da água por um solvente orgânico, mas não podem ser extraídos de volta para o interior de uma segunda fase aquosa como requerido pela técnica de SLM, a menos que possam ser convertidos em outra forma solúvel em água (Cordeiro *et al.*, 2000; Jönsson; Mathiasson, 2000).

Quimicamente é o mesmo princípio usado na LLE convencional, mas empregando um sistema de fluxo, o qual permite fácil automação e interfaciamento com outros instrumentos analíticos. A técnica MMLLE é mais facilmente interligada a cromatografia gasosa ou cromatografia líquida de fase normal, uma vez que o extrato é orgânico (Jönsson; Mathiasson, 2000).

Figura 4. Descrição esquemática da MMLLE (Jönsson; Mathiasson, 2000).

Estimulados pelos promissores resultados de pré-concentração, "clean-up" e redução do consumo de solventes orgânicos demonstrados por Jönsson *et al.* (2000) através da extração em membranas, Pedersen Bjergaard e Rasmussen, recentemente, introduziram um conceito alternativo, que combina os princípios da SLM e MMLLE com a natureza miniaturizada da SPME para obter as vantagens das três técnicas, e baseia-se no uso de uma fibra cilíndrica oca, de baixo custo, disponível e porosa, feita de polipropileno (Pedersen-Bjergaard; Rasmussen, 1999). O método resultante, denominado microextração em fase líquida (liquid-phase microextraction, LPME), também é considerado uma evolução dos métodos de microextração por solvente, uma vez que acrescenta uma característica protetora no sistema de microgota e/ou auxilia na formação de um filme líquido imiscível (Shen; Lee, 2002). O termo microextração em fase líquida foi introduzido pela primeira vez por He e Lee em 1997 para descrever um sistema de duas fases em uma microextração em solvente mas, atualmente, convencionou-se denominar LPME o sistema de extração em membrana no qual a extração ocorre dentro do lúmen da fibra oca de polipropileno, sem que a fase orgânica entre em contato direto com a solução da amostra e, assim, as soluções doadoras podem ser agitadas vigorosamente sem nenhuma perda na extração. A LPME baseada em fibras cilíndricas ocas constitui a alternativa mais robusta e adequada para a extração com membranas (Rasmussen; Pedersen-Bjergaard, 2004).

A Figura 5 ilustra a LPME em um fibra cilíndrica oca. Antes de cada extração, uma nova fibra é imersa no solvente orgânico para imobilizá-lo nos poros da membrana e o excesso tem que ser removido por imersão em água (Rasmussen; Pedersen-Bjergaard, 2004). A amostra aquosa de interesse normalmente é transferida para uma pequeno frasco com capacidade para 1 a 4 mL e a fibra de 1,5 a 10 cm é mergulhada na solução. O lúmen

da fibra é preenchido com microlitros do solvente de extração (15 a 25 μL), imiscível em água.

Figura 5. Esquema ilustrativo dos princípios básicos da LPME. (A) corresponde a amostra de interesse e (M) corresponde a matriz biológica.

A LPME pode ser usada em dois principais modos: sistema de duas fases e sistemas de três fases; o mecanismo de extração segue os mesmos princípios básicos desenvolvidos por Jönsson *et al.* (2000) e fundamenta-se na difusão e partição dos analitos entre uma fase aquosa e outra orgânica.

No sistema de duas fases, o analito i é extraído da solução aquosa (fase doadora, d), através de um solvente imiscível em água imobilizado nos poros de uma fibra cilíndrica oca, para o mesmo solvente orgânico (fase aceptora, org) presente no interior dessa fibra. O processo de extração na LPME no modo duas fases pode ser ilustrado como segue:

$$i_d \leftrightarrow i_{org}$$

A razão de distribuição ($K_{org/d}$) é definida como sendo a razão entre as concentrações do analito i nas fases orgânica e doadora em condições de equilíbrio. Para obter sucesso na LPME em duas fases, é necessário que o analito tenha elevada razão de distribuição. Valores elevados de $K_{org/d}$ são típicos de compostos moderadamente ácidos ou básicos e altamente hidrofóbicos, ou de compostos neutros e hidrofóbicos (Ho; Pederssen-Bjergaard; Rasmussen, 2002). Uma vez que a fase aceptora é orgânica, essa metodologia é mais compatível com técnicas analíticas como CG ou HPLC de fase normal (Rasmussen *et al.*, 2000).

Na LPME no modo três fases, o analito i é extraído da solução aquosa (fase doadora, d) através de um solvente orgânico imiscível em água imobilizado nos poros de uma fibra cilíndrica (fase orgânica, org) até outra fase aquosa (fase aceptora, a), presente no interior do lúmen da fibra cilíndrica. Nesse caso, a fase orgânica serve como uma barreira entre a fase aceptora e a fase doadora, prevenindo a mistura entre essas duas fases. O sistema de três fases é mais facilmente interligado à cromatografia líquida de fase reversa ou CE, uma vez que o extrato é aquoso (Rasmussen *et al.*, 2000).

Geralmente, o processo de extração do analito i no modo três fases pode ser ilustrado como segue:

$$i_d \leftrightarrow i_{org} \leftrightarrow i_a$$

O processo de LPME em um sistema de três fases é caracterizado pelos $K_{org/d}$ e $K_{a/org}$; a razão de distribuição $K_{a/d}$ entre a fase aceptora e doadora pode ser escrita como:

$$K_{a/d} = K_{org/d} \cdot K_{a/org}$$

Ajustes na composição das fases doadora e aceptora são críticos para o sucesso da LPME em três fases. Elevados $K_{a/d}$ ($\gg 1$) podem ser alcançados quando os analitos na fase aceptora são convertidos por reações, tais como, protonação ou complexação, para espécies que terão uma afinidade muito menor pelo solvente orgânico. Dessa forma, previne-se extrações do analito da fase aceptora para a fase orgânica. Portanto, o sistema de três fases também é adequado para extrações de compostos ácidos ou básicos com baixos valores de $K_{org/d}$, bem como elevados valores de $K_{a/org}$ (Ho; Pederssen-Bjergaard; Rasmussen, 2002; Psillakis, Kalogerakis, 2003).

Essa nova metodologia de extração mostrou ser uma alternativa atrativa em relação a outros tipos de extração (LLE, SPE e SPME) pois, além de ser simples, rápida, apresentar preços compatíveis com as colunas de extração em fase sólida, é virtualmente livre de solventes. Aliado a isso, após 30 a 50 minutos são obtidos valores de enriquecimento, a partir de matrizes biológicas, muito maiores (de 20 a 160 vezes), com a possibilidade de ajustes na seletividade de extração através da modificação do solvente de extração de modo semelhante a LLE. Esse método apresenta ainda elevados valores recuperação na extração e não há possibilidade de contaminação cruzada entre análises consecutivas, uma vez que cada fibra é utilizada uma única vez (Halvorsen; Pedersen-Bjergaard; Rasmussen, 2001; Pedersen-Bjergaard; Rasmussen, 1999; Andersen *et al.*, 2002; Ho; Pedersen-Bjergaard; Rasmussen, 2000).

1.4. Mirtazapina

1.4.1. Propriedades estereosseletivas

A mirtazapina (1,2,3,4,10,14b-hexaidro-2-metil-pirazino [2,1-a] pirido [3,2-c] benzapina), fármaco selecionado para o presente estudo, é um novo antidepressivo com um perfil farmacológico único, combinando uma dupla ação no sistema neurotransmissor serotoninérgico e noradrenérgico. A mirtazapina age bloqueando os receptores pré-sinápticos α_2 -adrenérgicos e os receptores pós-sinápticos serotoninérgicos tipo 2 e tipo 3 (Timmer; Paanakker; Vries, 1997; Delbressine, *et al.*, 1998; Gorman, 1999). A mirtazapina é membro de uma série química de compostos conhecidos como piperazinoazepinas, não relacionada com nenhuma outra classe conhecida de fármacos psicotrópicos (Cohen *et al.*, 1997; Fawcett; Barkin, 1998). A mirtazapina foi primeiramente aprovada para uso em setembro de 1994 na Alemanha, e foi permitida para o tratamento da depressão nos Estados Unidos a partir de agosto de 1996. Desde então ela tem sido aprovada para uso diário como antidepressivo em um número cada vez maior de outros países (Fawcett; Barkin, 1998). No Brasil é comercializada como Remeron[®].

A mirtazapina é empregada na clínica como um racemato (mistura 50:50), embora os enantiômeros (+)-(S)-mirtazapina e (-)-(R)-mirtazapina (Figura 6) apresentem efeitos terapêuticos enantiosseletivos. As propriedades bloqueadoras do α_2 -heteroreceptor estão relacionadas tanto com o (+)-(S)- quanto com o (-)-(R)-mirtazapina; entretanto, o bloqueio do α_2 -autoreceptor, além dos seus efeitos antagonistas no receptor tipo 5HT₂, estão primariamente dependentes da ação do (+)-(S)-enantiômero, enquanto que a atividade

antagonista do receptor $5HT_3$ e o bloqueio do α_2 -heteroreceptor residem predominantemente no (-)-(R)-mirtazapina (Fawcett; Barkin, 1998).

Figura 6. Estrutura dos enantiômeros da mirtazapina (Dodd; Burrows; Norman, 2000).

A mirtazapina é um fármaco de carácter básico e lipofílico que, quando administrada por via oral, é rapidamente absorvida; apresenta biodisponibilidade de 50% e a concentração plasmática máxima é alcançada em 2 horas. A meia-vida de eliminação da mirtazapina é 20-40 horas e ela é razoavelmente ligada às proteínas plasmáticas, com concentrações livres $\leq 15\%$ (Timmer; Sitsen; Delbressine, 2000). A sua disposição cinética depende do sexo e da idade: mulheres e idosos apresentam concentrações plasmáticas maiores que homens e jovens adultos (Cohen *et al.*, 1997; Timmer; Sitsen; Delbressine, 2000; Gareri *et al.*, 2000). O antidepressivo mirtazapina é extensivamente metabolizado, em grande parte por vias oxidativas envolvendo o sistema enzimático citocromo P450 (CYP). Já foram identificadas 5 isoformas do citocromo P450 envolvidas no seu metabolismo *in vitro*: CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP3A4 e CYP2D6 (Störmer; Moltke; Greenblatt, 2000). Dentre essas isoformas, as mais importantes são as isoenzimas CYP2D6 e CYP3A4 (Timmer; Sitsen; Delbressine, 2000).

A mirtazapina é parcialmente metabolizada a 8-hidroximirtazapina (aproximadamente 40%). O esquema de biotransformação é mostrado na Figura 7. Essa reação é catalisada principalmente pela isoenzima CYP2D6 e em menor extensão pela CYP1A2. A mirtazapina sofre também N-Desmetilação (aproximadamente 25%) e N-Oxidação (aproximadamente 10%), catalisadas pela CYP3A4, resultando na formação de desmetilmirtazapina e N-óxido-mirtazapina. Esses metabólitos formados são conjugados com o ácido glicurônico ou, em menor extensão, com ácido sulfúrico. A mirtazapina também sofre conjugação direta com o ácido glicurônico formando uma amônia quaternária N^+ -Glicuronida (aproximadamente 25%) (Delbressine *et al.*, 1998; Timmer; Sitsen; Delbressine, 2000).

Figura 7. Esquema da biotransformação da mirtazapina: 1 = 8-hidroxilação seguida de conjugação; 2 = N^+ -Glicuronidação; 3 = N-Oxidação; 4 = Desmetilação seguida por conjugação (Delbressine *et al.*, 1998).

O único metabólito da mirtazapina com atividade farmacológica encontrado no plasma, a desmetilmirtazapina, é formada no fígado e contribui entre 3-6% do total do perfil farmacodinâmico do fármaco (Delbressine *et al.*, 1998).

A farmacocinética da mirtazapina também aparece como sendo enantiosseletiva, resultando em elevadas concentrações plasmáticas e longos tempos de meia-vida do (-)-(R)-mirtazapina quando comparados com o (+)-(S)-mirtazapina. Nesse contexto, a

quantificação separada dos enantiômeros em fluidos biológicos pode ser importante na determinação da resposta clínica (Dodd; Burrows; Norman, 2000).

A enantiosseletividade na farmacocinética da mirtazapina pode provavelmente ser atribuída ao seu metabolismo. O enantiômero (-)-(R)-mirtazapina é preferencialmente metabolizado via N^+ -glicuronidação, enquanto que o enantiômero (+)-(S)-mirtazapina é metabolizado preferencialmente via 8-hidroxilação, seguida pela conjugação com o ácido glicurônico. Entretanto, em contraste com o 8-hidroxiglicuronídeo, a mirtazapina na forma de amônia quaternária não é adequada, direta e irreversivelmente excretada do corpo. Provavelmente acontece liberação da mirtazapina, o que conduz a uma recirculação tardia do fármaco. Isto pode explicar porque a taxa de eliminação do (+)-(S)-mirtazapina é maior que para o enantiômero (-)-(R)-mirtazapina (Timmer; Sitsen; Delbressine, 2000).

Por outro lado, a análise dos enantiômeros separados revelou efeitos diferentes do polimorfismo genético do CYP2D6. Para o enantiômero (-)-(R)-mirtazapina, não há diferenças entre os metabolizadores rápidos (EM, extensive metabolizer) e os metabolizadores lentos (PM, poor metabolizer) para nenhum dos parâmetros cinéticos. Entretanto, para o (+)-(S)-mirtazapina, a área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo é maior em PM, e observa-se um correspondente tempo de meia-vida mais longo. Considerando que os PM apresentam deficiência na isoforma CYP2D6, e por isso podem hidroxilar a mirtazapina em uma menor extensão, espera-se concentrações maiores da mirtazapina na forma N^+ -glicuronídeo (Timmer; Sitsen; Delbressine, 2000).

1.4.2. *Análise enantiosseletiva*

O primeiro método analítico de determinação da mirtazapina em fluidos biológicos que se tem notícia data de 1987 e foi escrito por Paanakker e Hal (1987). Entretanto, nesse trabalho, os autores propõem a determinação da forma racêmica do fármaco por cromatografia gasosa sem a distinção de seus enantiômeros e metabólitos. A partir de então, alguns trabalhos vêm sendo publicados nos quais a determinação da mirtazapina, bem como de seu metabólito ativo, é feita empregando principalmente HPLC (Delbressine *et al.*, 1998; Maris; Dingler; Niehues, 1999; Dodd; Burrows; Norman, 2000; Labat *et al.*, 2002; Romiguières *et al.*, 2002; Morgan; Tapper; Spencer, 2003; Ptacek; Klima; Macek, 2003; Shams; Hiemke; Härtter, 2004). Entretanto, nenhum trabalho tratava da determinação das formas individuais dos enantiômeros da mirtazapina até o ano de 2000, quando Dodd; Burrows; Norman (2000), propuseram a determinação dos enantiômeros da mirtazapina em plasma humano utilizando para isso uma coluna quiral derivada de amilose.

A mirtazapina foi isolada do plasma por SPE. A separação cromatográfica foi alcançada usando a coluna Chiralpak AD e fase móvel constituída por hexano:isopropanol:etanol (98:1:1, v/v/v). Os enantiômeros da mirtazapina e padrão interno imipramina foram detectados por sua absorção em 290 nm. O método foi validado para cada analito, na concentração de 10 a 100 ng mL⁻¹, para os parâmetros de limite de quantificação, precisão, exatidão, recuperação e linearidade. Os tempos de retenção foram de 3,8 min para a imipramina, 12,5 min para o (+)-(S)-mirtazapina e 15,0 min para o (-)-(R)-mirtazapina. A resolução dos dois picos da mirtazapina foi calculada como $R_s=1,6$. Esse método foi usado para determinar os níveis dos enantiômeros da mirtazapina em

plasma de alguns pacientes que estavam sendo tratados para depressão com mirtazapina racêmica.

Mais recentemente, no ano de 2004, Mandrioli; *et al.*, desenvolveram um método de análise enantiosseletiva da mirtazapina e seu principal metabólito ativo, desmetilmirtazapina, em plasma humano utilizando para isso CE como instrumento analítico, carboximetil- β -ciclodextrina (em tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 2,5), como seletor quiral e SPE, como técnica de preparação das amostras. A separação enantiosseletiva dos analitos foi alcançada em 2,5 min em um capilar de sílica fundida (50 μ m de diâmetro interno; 48,5 cm de comprimento total; 8,5 cm de comprimento efetivo) com detecção em 205 nm. A triprolidina foi empregada como padrão interno. O método foi validado para cada enantiômero, na concentração de 7,5 a 150 ng mL⁻¹, com limite de quantificação de 5 ng mL⁻¹. A recuperação média foi de 89% para a mirtazapina e 73% para a desmetilmirtazapina. Após seu desenvolvimento e validação, a aplicabilidade deste método enantiosseletivo foi avaliada em um estudo de disposição cinética com alguns pacientes tratados com a mirtazapina racêmica.

Também em 2004, Paus *et al.* propuseram a análise enantiosseletiva da mirtazapina e seus metabólitos em plasma de pacientes tratados para depressão. Neste caso, as amostras foram preparadas por LLE, separadas por HPLC em uma coluna Chirobiotic V e detectadas por espectrometria de massas (mass spectrophotometry, MS) no modo “electrospray”. O método validado para cada enantiômero (faixa de concentração de 1 a 100 ng mL⁻¹) apresentou limite de quantificação de 0,5 ng mL⁻¹ e coeficientes de variação (CV) intra e interensaio entre 3,3% e 11,7%, para todos os enantiômeros, bem como recuperação superior a 40% para ambos enantiômeros. A partir dos resultados encontrados com a

análise dos metabólitos do fármaco, os autores ainda destacaram o papel de fármacos inibidores do CYP2D6 no metabolismo enantiosseletivo da mirtazapina.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1. Desenvolver um novo método para a análise enantiosseletiva do antidepressivo mirtazapina em amostras de plasma humano, utilizando a extração líquido-líquido como técnica de preparação das amostras, e empregando o método direto de separação quiral em HPLC com fases estacionárias quirais;
2. Avaliar a técnica de microextração em fase líquida empregando fibras cilíndricas ocas para o pré-tratamento e pré-concentração das amostras;
3. Validar estes métodos de resolução e quantificação dos enantiômeros do fármaco segundo os parâmetros estabelecidos na literatura e aplicá-los em um estudo piloto de disposição cinética em voluntário sadio;
4. Comparar as duas técnicas de preparação de amostras.

MATERIAIS E

MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Reagentes e solventes

Os solventes hexano, metanol, etanol, isopropanol, acetonitrila e tolueno foram grau cromatográfico e obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) ou EM Science (Gibbstown, NJ, EUA). A dietilamina foi fornecida pela Fluka (Buchs, Suíça) e o hidróxido de sódio foi obtido da Nuclear (São Paulo, SP, Brasil), ambos grau p.a.. Os demais reagentes empregados na preparação das soluções tampão fosfato de sódio, borato de sódio e acetato de amônio, bem como o sal cloreto de sódio, utilizado na etapa de otimização da extração em membrana, também foram grau p.a., obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

3.1.2. Soluções-padrão

A mirtazapina racêmica (*rac*-mirtazapina, código do laboratório Org 3770, pureza $\geq 98\%$) e seus metabólitos desmetilmirtazapina (código do laboratório Org 30628) e 8-hidroximirtazapina (código do laboratório Org 3838) utilizados na preparação das soluções-padrão foram gentilmente cedidos pela Analytical Control Labs., N.V. Organon (Oss, Holanda). As soluções-padrão de *rac*-mirtazapina utilizadas para o trabalho cotidiano foram preparadas em metanol, nas concentrações de 5,0 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, à partir da diluição de solução-padrão estoque preparada na concentração de 1,0 mg mL^{-1} . Uma solução-padrão de mefloquina racêmica (*rac*-mefloquina) (Figura 8) foi preparada em metanol na

concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ e empregada como padrão interno. A *rac*-mefloquina foi gentilmente cedida pela Novartis (Basel, Suíça). Todas as soluções foram armazenadas a -20°C e protegidas da ação direta da luz; sob essas condições, elas permaneceram estáveis por pelo menos 3 meses.

As soluções dos metabólitos da mirtazapina e de outros fármacos avaliados como interferentes foram preparadas em metanol, na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$.

Figura 8. Estrutura dos enantiômeros da mefloquina (Souri; Farsam; Jamali, 1997).

3.1.3. Amostras de plasma

As amostras de plasma humano, livres da *rac*-mirtazapina, dos seus metabólitos e do padrão interno, denominadas de plasmas branco, foram fornecidas pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo e foram armazenadas a -20°C até o momento da análise. As amostras em uso eram inicialmente descongeladas à temperatura ambiente e centrifugadas durante 10 minutos a $2000 \times g$ para a remoção de partículas suspensas.

3.1.4. Equipamentos

3.1.4.1. Sistema cromatográfico

As análises por HPLC foram conduzidas usando um cromatógrafo da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), composto de uma bomba modelo LC-10AT VP de duplo pistão e um detector por absorção no UV-Visível modelo SPD-10A VP, operando em 292 nm. As injeções foram realizadas manualmente com injetor Rheodyne modelo 7125 (Rheodyne, Cotati, CA, EUA) e amostrador de 50 µL. Os dados foram coletados usando integrador Chromopak modelo CR6A (Shimadzu, Kyoto, Japão). Também foi empregado um detector por dicroísmo circular da marca Jasco, modelo CD-1595 (Jasco, Tóquio, Japão), para estabelecer a ordem de eluição dos enantiômeros; um espectrofotômetro operando na região do UV-Vis-Nir da marca Hitachi modelo U-3501 (Hitachi, Tóquio, Japão) com celas de quartzo de 1,000 cm de caminho óptico foi empregado para avaliar o melhor comprimento de onda de absorção dos enantiômeros da mirtazapina.

3.1.4.2. Equipamentos empregados na preparação das fases móveis

Um pHmetro da marca Corning, modelo 430 (Nova Iorque, NY, EUA), foi empregado para medir o pH das soluções tampão, utilizadas como constituintes das fases móveis nas análises sob condições de fase reversa.

As soluções tampão foram preparadas pela dissolução de sais em água e seus valores de pH foram ajustados com soluções de ácidos ou bases. Todas as soluções foram armazenadas a 4 °C por um período de até 5 dias. A água utilizada na preparação das soluções foi purificada para a eliminação de resíduos orgânicos e inorgânicos empregando

o sistema MILLI-Q-PLUS[®] Millipore/Millipore Corporation (Bedford, MA, EUA). Antes do uso, as soluções tampão foram filtradas em uma membrana da marca Millipore, com poros de 0,45 μm (Bedford, MA, EUA).

As fases móveis preparadas pela mistura de solução tampão e um solvente orgânico foram desgaseificadas em um ultrasson da marca Thorton Unique, modelo USC1450 (Santo André, SP, Brasil), durante 10 minutos, juntamente com um sistema a vácuo.

3.1.4.3. Equipamentos empregados na preparação das amostras

Na etapa de preparação das amostras empregando a LLE foram utilizados (i) um agitador de tubos da marca Phoenix, modelo AP56 (Araraquara, SP, Brasil), (ii) um agitador horizontal da marca Pachane, modelo PA241 (Piracicaba, SP, Brasil) e (iii) uma centrífuga Excelsa Baby II[®], modelo 206-R da marca Fanen (São Paulo, SP, Brasil). Por sua vez, a microextração em fase líquida utilizou (i) um agitador de tubos da marca Phoenix, modelo AP56 (Araraquara, SP, Brasil) e (ii) um agitador magnético da marca Marconi, modelo TE 085 (Piracicaba, SP, Brasil). Durante o procedimento de LPME, além dos equipamentos acima citados foram empregados frascos da marca Supelco, com capacidade para 4 mL (Supelco, Bellefonte, PA, EUA), fibras cilíndricas microporosas de polipropileno, da marca Akzo Nobel, modelo Q 3/2 Acurrel KM (Akzo Nobel, Wuppertal, Germany), uma barra de agitação magnética da marca Supelco, 10 mm x 3 mm (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) e duas microseringas com capacidade para 250 μL , sendo uma da marca Agilent Technologies, modelo LC 250 μL FN (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) e a outra da marca Hamilton company, modelo 1725RNR, 250 μL (Hamilton company, Reno, Nevada, EUA).

3.1.5. Colunas com fases estacionárias quirais e coluna de guarda

Várias colunas quirais baseadas em derivados de amilose e celulose e algumas colunas quirais baseadas em proteínas foram avaliadas frente a diversas condições cromatográficas de análise, tanto no modo fase normal como fase reversa, com o objetivo de definir a fase estacionária quiral mais apropriada para a separação dos enantiômeros da mirtazapina, com tempo de análise considerado relativamente curto. Assim, foram avaliadas as seguintes colunas quirais:

Coluna Chiralcel OD-H (150 mm x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA) constituída do derivado de celulose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 5 µm, empregada em condições de fase normal.

Coluna Chiralcel OF (250 mm x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA) constituída do derivado de celulose tris (4-clorofenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 10 µm, empregada em condições de fase normal.

Coluna Chiralpak AS (250 mm x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA) constituída do derivado de amilose tris ((S)- α -metilbenzilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 10 µm, empregada em condições de fase normal.

Coluna Chiralpak AD (250 mm x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA) constituída do derivado de amilose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 10 µm, empregada em condições de fase normal.

Coluna Chiralcel OG (250 mm x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA) constituída do derivado de celulose tris (4-metilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 10 μm , empregada em condições de fase normal.

Coluna Chiralcel OJ (250 mm x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA) constituída do derivado de celulose tris (4-metilbenzoato) recobrindo partículas de sílica de 10 μm , empregada em condições de fase normal.

Coluna Chiralcel OB-H (150 mm x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA) constituídas do derivado de celulose tribenzoato recobrindo partículas de sílica de 5 μm , empregada em condições de fase normal.

Coluna Chiralpak AD-RH (150 mm x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA) constituída do derivado de amilose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 5 μm , empregada em condições de fase reversa.

Coluna Ultron ES-OVM (150 mm x 4,6 mm, Rockland Technologies, Newport, DE, EUA), constituída pela proteína ovomucóide ligada à partículas de sílica de 5 μm , empregada em condições de fase reversa.

Coluna Chiral AGP (150 mm x 4,0 mm, ChromTech AB, Hägersten, Suécia) constituída por α_1 -glicoproteínas ácida ligada à partículas de sílica de 5 μm , empregada em condições de fase reversa.

Para análise de amostras de plasma, as colunas quirais avaliadas foram protegidas por coluna de guarda CN Lichrospher 100, constituída por grupamentos cianopropil ligados á partículas de sílica de 5 μm (4 x 4 mm, Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Avaliação das colunas cromatográficas quirais

A resolução dos enantiômeros da mirtazapina foi avaliada a $23 (\pm 2) ^\circ\text{C}$. Alíquotas de 25 μL de soluções-padrão de *rac*-mirtazapina, na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada enantiômero, foram evaporadas à completa secura sob fluxo de ar comprimido. Os resíduos foram dissolvidos em 100 μL de fase móvel e 50 μL foram cromatografados. As colunas CHIRALCEL OD-H, CHIRALCEL OF, CHIRALCEL OJ, CHIRALCEL OB-H, CHIRALCEL OG, CHIRALPAK AD e CHIRALPAK AS foram empregadas em condições de fase normal, com fases móveis variadas, constituídas por misturas de hexano e etanol ou iso-propanol, em diferentes proporções, respeitando as limitações de cada coluna estabelecidas por seus fabricantes; a adição de uma base orgânica (dietilamina) também foi considerada e otimizada visando reduzir a interação do analito com os grupos silanóis residuais da coluna cromatográfica, amenizando, dessa forma, as caudas nos picos dos compostos básicos estudados, o que dificultaria a resolução.

Colunas com fases protéicas também foram avaliadas. Neste caso, e no caso da coluna Chiralpak AD-RH, foram empregadas fases móveis tamponadas adicionadas de solventes orgânicos. O pH e a concentração das soluções tampão aquosas, bem como, o tipo de solvente orgânico (etanol, metanol, acetonitrila e iso-propanol) empregado foram parâmetros importantes na otimização da resolução dos enantiômeros.

A separação foi considerada adequada quando apresentou resolução (R_s) satisfatória dos enantiômeros da mirtazapina, bem como os demais parâmetros cromatográficos,

seletividade e eficiência da coluna (fator de retenção (k), fator de separação (α) e número de pratos (N), respectivamente).

O fator de retenção (k) é dado como:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

onde, t_R corresponde ao tempo de retenção do composto de interesse e t_M ao tempo de retenção de um composto não retido na coluna. Uma separação é dita satisfatória quando k está entre 2 e 10 (Snyder; Kirkland; Glajch, 1997).

O fator de separação (α) é dado como:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

onde, k_1 corresponde ao fator de retenção do composto menos retido e k_2 ao fator de retenção do composto mais retido na coluna.

Os parâmetros número de pratos (N) e resolução (R_s) somente foram avaliados para os sistemas que apresentaram separações com valores de k e α satisfatórios.

O número de pratos (N) é dado como:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2$$

onde, t_R corresponde ao tempo de retenção do composto de interesse e w_b a largura da base do pico do composto de interesse.

A resolução (R_s) é dada como:

$$R_s = 2 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}} \right)$$

onde, t_{R2} corresponde ao tempo de retenção do composto mais retido e t_{R1} do menos retido. w_{b1} e w_{b2} correspondem as larguras dos picos do composto menos retido e do mais retido, respectivamente.

3.2.2. Condições cromatográficas para análise enantiosseletiva da mirtazapina em plasma

A melhor resolução dos enantiômeros da mirtazapina foi alcançada na coluna Chiralpak AD empregando a fase móvel constituída por hexano:etanol (98:2, v/v) mais 0,1% de dietilamina. A vazão foi mantida em 1,2 mL min⁻¹ quando usada a LLE e 1,5 mL min⁻¹ quando usada a LPME. A detecção foi feita em 292 nm.

3.2.3. Procedimento de preparação da amostra

Uma vez estabelecidas as condições de separação dos enantiômeros, a etapa seguinte foi otimizar o procedimento de preparação das amostras, afim de estabelecer as condições ótimas de máxima extração do fármaco de interesse e mínima extração dos agentes endógenos e interferentes do plasma.

Tais condições foram avaliadas primeiramente empregando a técnica de LLE e, em seguida, a LPME.

O procedimento de LLE otimizado está descrito na Figura 9, enquanto que a otimização do método empregando LPME está presente na seção 3.2.3.2..

3.2.3.1. Extração líquido-líquido

Para otimização desse procedimento, as análises foram realizadas com amostras de 1 mL de plasma branco, previamente centrifugado durante 10 minutos a 2000 x g, fortificadas com 25 µL das soluções-padrão de (+)-(S)-mirtazapina e (-)-(R)-mirtazapina na concentração de 20 µg mL⁻¹. Amostras de plasma branco, livres do fármaco, e alíquotas de 1 mL de água purificada no sistema MILLI-Q-PLUS[®] também foram processadas, sob as mesmas condições de análise acima citadas, para verificar a presença de interferentes endógenos no plasma e a pureza dos reagentes, respectivamente.

Em todos os experimentos envolvidos na definição do procedimento de extração, o meio aquoso foi alcalinizado, para manter o fármaco de caráter básico na forma não dissociada e assim, viabilizar a sua extração pelo solvente orgânico. A influência do pH foi avaliada através do uso de soluções de hidróxido de sódio, nas concentrações de 1,0 e 10 mol L⁻¹.

Na avaliação do solvente orgânico extrator utilizado na LLE, foram empregados volumes de 4 mL de diclorometano, hexano, iso-propranol, tolueno e éter diiso-propílico, bem como misturas desses solventes em diferentes proporções, sendo recuperados apenas 3 mL após o término da extração.

Na etapa de otimização da extração, também foram avaliados os parâmetros de agitação (tempo e potência) e volume do solvente orgânico. Parâmetros gerais como procedimento de evaporação (fluxo de ar ou N₂) do solvente, procedimento de lavagem do injetor após cada injeção (fase móvel + concentrações variadas de dietilamina e fase móvel s/ dietilamina) e procedimento de dissolução dos resíduos foram otimizados no decorrer do desenvolvimento analítico.

3.2.3.2. Microextração em fase líquida empregando fibras cilíndricas microporosas

Durante a otimização do método empregando LPME, as análises foram realizadas utilizando diferentes volumes de amostras de plasma branco, previamente centrifugado durante 10 minutos a 2000 x g, fortificadas com 25 µL de solução-padrão de (+)-(S)-mirtazapina e (-)-(R)-mirtazapina, na concentração de 20 µg mL⁻¹, e 25 µL da solução-padrão de *rac*-mefloquina (padrão interno), na concentração de 20 µg mL⁻¹, e diluídas com água purificada no sistema MILLI-Q-PLUS[®], para um volume total de 4 mL. Amostras de plasma branco livres de *rac*-mirtazapina e do padrão interno, bem como alíquotas de 4 mL de água purificada no sistema MILLI-Q-PLU[®] também foram processadas, nas mesmas condições acima, para verificar a presença de interferentes endógenos no plasma e a pureza dos reagentes, respectivamente.

Na etapa de otimização do procedimento de extração empregando LPME foram avaliados os parâmetros de (i) tamanho da fibra cilíndrica oca, (ii) tipo de solvente orgânico, (iii) razão volumétrica entre as fases aceptora-doadora (V_{org}/V_d), (iv) agitação da

amostra, (v) tempo de extração, (vi) ajuste de pH, (vii) força iônica, (viii) modificadores orgânicos, (ix) múltiplas extrações e (x) temperatura de extração.

Figura 9. Procedimento de preparação das amostras de plasma humano empregando a LLE.

A recuperação dos enantiômeros da mirtazapina no procedimento otimizado foi realizada alcalinizando 700 µL de plasma (previamente centrifugado) com 150 µL de uma solução de NaOH 10 mol L⁻¹ e diluindo essa fase doadora com água purificada no sistema MILLI-Q-PLUS[®] para 4 mL. Para cada extração, 7,0 cm de uma nova fibra cilíndrica

porosa de polipropileno com diâmetro interno de 600 μm , espessura das paredes de 200 μm e poros de 0,2 μm foi fixada pelas extremidades e imersa em tolueno durante 30 segundos para imobilizar o solvente nos poros da fibra. O excesso de solvente foi removido pela imersão, sob agitação, em água purificada no sistema MILLI-Q-PLUS®. Após imobilização, cerca de 22 μL do solvente acceptor foi introduzido no interior da fibra cilíndrica oca usando uma microseringa. O sistema foi então mergulhado na matriz plasmática. Durante toda a extração, a unidade foi agitada constantemente. Após 30 minutos de extração, a fase acceptora foi retraída da fibra usando outra microseringa e transferida para um tubo de fundo cônico (Figura 10). Por último, o solvente extrator foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e o resíduo foi dissolvido em 80 μL da fase móvel e analisado em HPLC, sob as condições cromatográficas apresentadas na seção 3.2.2..

Figura 10. Foto ilustrativa demonstrando a simplicidade do sistema LPME.

3.3. Ordem de eluição dos enantiômeros da mirtazapina

A ordem de eluição dos enantiômeros da mirtazapina foi definida empregando a detecção por dicroísmo circular (circular dichroism, CD) sob as mesmas condições cromatográficas descritas acima e comparando os espectros de CD dos enantiômeros puros com aqueles apresentados por Moody *et al.* (2002).

A ordem de eluição também foi avaliada pela análise dos enantiômeros puros obtidos por separação semipreparativa, nas condições estabelecidas nesse trabalho, usando o procedimento descrito por Dodd; Burrows; Norman (2000).

3.4. Validação

As condições de preparação das amostras juntamente com a etapa de análise cromatográfica do método foram validadas para assegurar a sua qualidade, confiabilidade e aplicabilidade.

O método desenvolvido foi validado segundo recomendações da literatura (Peng; Chiou, 1990; Quattrocchi; Andrizzi; Laba, 1992; Shah *et al.*, 1992; Bressole; Bromet-Petit; Audran, 1996; Snyder; Kirkland; Glajch, 1997; Causon, 1997; Hubert *et al.*, 1999; FDA, 2001; Resolução - RE nº 899, Anvisa, 2003) para análise de fármacos em fluidos biológicos, visando a aplicação em estudos de disposição cinética.

3.4.1. Recuperação

A recuperação do método LLE foi avaliada analisando amostras de 1 mL de plasma branco fortificadas com *rac*-mirtazapina nas concentrações plasmáticas de 6,25; 12,5; 62,5; 125 e 625 ng de cada enantiômero mL⁻¹, em triplicata para cada concentração, e processadas de acordo com os procedimentos de preparação de amostras previamente estabelecidos. As concentrações dessas amostras foram calculadas com base em curvas analíticas de soluções-padrão não submetidas ao procedimento de extração, em duplicata para cada concentração. A recuperação do método LPME, por outro lado, foi avaliada analisando amostras de 700 µL de plasma branco fortificadas com *rac*-mirtazapina nas concentrações plasmáticas de 12,5; 62,5; 125 e 625 ng de cada enantiômero mL⁻¹. Antes da análise cromatográfica a fase aceptora era acrescida de 25 µL da solução-padrão de *rac*-mefloquina.

A recuperação é dada como:

$$R = \frac{\text{Concentração obtida}}{\text{Concentração real}} \times 100$$

3.4.2. Linearidade

Para o processo de LLE, a linearidade foi avaliada através da construção de curvas analíticas de amostras de plasma branco (1mL) previamente centrifugadas e fortificadas com *rac*-mirtazapina nas concentrações plasmáticas de 5,0; 6,25; 12,5; 62,5; 100; 250 e 625 ng de cada enantiômero mL⁻¹ (n = 2 para cada concentração). Após a extração, as fases orgânicas foram evaporadas, sob fluxo de ar comprimido, e os resíduos foram dissolvidos em 100 µL da fase móvel para posterior análise em HPLC. O processo de LPME foi

avaliado de forma semelhante usando amostras de plasma branco (700 μL) previamente centrifugadas e fortificadas com *rac*-mirtazapina nas concentrações plasmáticas de 6,25; 12,5; 62,5; 125; 625 ng de cada enantiômero mL^{-1} e 25 μL da solução-padrão de *rac*-mefloquina na concentração plasmáticas de 500 ng mL^{-1} ($n = 2$ para cada concentração).

A partir dos resultados encontrados, foram construídas as curvas analíticas relacionando a altura (LLE) ou razão de áreas (LPME) dos picos (eixo das abcissas) *versus* suas respectivas concentrações (eixo das ordenadas). A análise estatística dos dados foi obtida pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados e expressa pela equação de primeira ordem $y = ax + b$, onde, (a) corresponde ao coeficiente angular, dado pela inclinação da reta, e (b) corresponde ao coeficiente linear, dado pelo ponto de interseção da reta com o eixo das ordenadas.

A faixa linear foi calculada usando o coeficiente de determinação (r^2), definindo a menor concentração como o mais baixo calibrador e removendo os calibradores mais altos até que fosse encontrado um coeficiente acima de 0,98 (Anvisa, Resolução-RE nº 899, 2003).

3.4.3. Limite de quantificação

Para a LLE, o limite de quantificação foi determinado usando 1 mL de plasma fortificado ($n=5$) com 5 ng de cada enantiômero mL^{-1} . Essas amostras foram analisadas com base em uma curva analítica preparada com dados de amostras de plasma fortificadas com *rac*-mirtazapina nas concentrações plasmáticas de 6,25; 12,5; 62,5; 125; 625 de cada enantiômero mL^{-1} , em duplicata para cada concentração. O limite de quantificação para a LPME foi determinado a partir de 700 μL de plasma fortificado ($n=5$) com 6,25 ng de cada

enantiômero mL^{-1} e 500 ng mL^{-1} do padrão interno e analisado nas mesmas condições acima citadas.

3.4.4. Precisão (repetibilidade) e exatidão

O cálculo da precisão normalmente é expresso em função do coeficiente de variação ou estimativa do desvio padrão relativo (CV%) (Shah *et al.*, 1992).

A precisão é dada como:

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100$$

onde, CV% corresponde ao coeficiente de variação; s é a estimativa do desvio padrão e $\bar{X}$ é a média das medidas em replicata para cada concentração.

O cálculo da exatidão é normalmente expresso em função da porcentagem do erro relativo (Quattrocchi; Andrizzi; Laba, 1992).

A exatidão é dada como:

$$E(\% \text{ de erro}) = \frac{\text{Valor obtido} - \text{Valor real}}{\text{Valor real}} \times 100$$

3.4.4.1. Precisão e exatidão intra-ensaio

Alíquotas de 1 mL de plasma humano fortificadas com concentrações plasmáticas de 10, 50 e 250 ng mL^{-1} de cada enantiômero, em quintuplicata, foram submetidas ao processo de LLE e analisadas frente a uma curva analítica preparada a partir de amostras de plasma fortificadas nas concentrações plasmáticas de 6,25; 12,5; 50; 100 e 250 de cada

enantiômero mL^{-1} , em duplicata para cada concentração. As amostras e a curva analítica foram preparadas e avaliadas no mesmo dia. Alíquotas de 700 μL de plasma humano fortificadas com concentrações plasmáticas de 15, 100 e 500 ng de cada enantiômero mL^{-1} , e com padrão interno na concentração de 500 ng mL^{-1} foram submetidas ao processo de LPME e analisadas frente a uma curva analítica preparada a partir de amostras de plasma fortificadas nas concentrações plasmáticas de 6,25, 12,5, 62,5, 125, 625 de cada enantiômero mL^{-1} , nas mesmas condições acima citadas.

3.4.4.2. Precisão e exatidão interensaios

Alíquotas de 1 mL de plasma humano fortificadas com concentrações plasmáticas de 10, 50 e 250 ng de cada enantiômero mL^{-1} foram submetidas ao processo de LLE e analisadas durante 5 dias consecutivos, empregando uma nova curva analítica a cada dia. Por sua vez, alíquotas de 700 μL de plasma humano fortificadas com concentrações plasmáticas de 15, 100 e 500 ng de cada enantiômero mL^{-1} , e com padrão interno na concentração de 500 ng mL^{-1} foram submetidas ao processo de LPME e analisadas nas mesmas condições acima citadas.

3.4.5. Seletividade

A seletividade avaliou a interferência de alguns dos metabólitos e/ou fármacos que poderiam estar presentes em amostras reais obtidas de voluntários sadios ou pacientes, pela análise comparativa dos seus tempos de retenção. A análise foi realizada empregando alíquotas de 25 μL de soluções-padrão tanto do fármaco de interesse como de outros fármacos co-administrados na concentração de 1,0 mg mL^{-1} .

Os tempos de retenção (em minutos) dos enantiômeros da mirtazapina foram usados como referência. Nos casos em que se observou interferência do fármaco na análise dos enantiômeros, por proximidade ou coincidência nos tempos de retenção, esses fármacos foram novamente analisados na concentração máxima do intervalo terapêutico. Aqueles fármacos que ainda apresentaram interferência foram submetidos ao processo de extração e novamente analisados.

3.4.6. Estudo de estabilidade

Estabelecidas as condições cromatográficas e de preparação das amostras, o método desenvolvido e validado foi submetido ao estudo de estabilidade segundo recomendações da literatura (FDA, 2001; Resolução-RE nº 899, Anvisa, 2003) para análise de fármacos em fluidos biológicos. Esse estudo foi feito apenas usando a LPME como técnica de preparação da amostra.

3.4.6.1. Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento

Para verificação dessa estabilidade utilizou-se três amostras de plasma fortificado com (+)-(S)-mirtazapina e (-)-(R)-mirtazapina nas concentrações baixa (15 ng mL^{-1}) e alta (500 ng mL^{-1}). As amostras foram estocadas a -20°C , durante 24 horas, e descongeladas à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas por 24 horas nas mesmas condições de congelamento. O ciclo de congelamento e descongelamento foi repetido duas vezes mais, quantificando-se o fármaco presente nas amostras após o terceiro ciclo.

Os resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas e analisados pelo método do Teste *t* student, $p \leq 0,05$.

3.4.6.2. Estabilidade nas mesmas condições de tempo e análise

Três amostras de plasma fortificado com (+)-(S)-mirtazapina e (-)-(R)-mirtazapina nas concentrações baixa (15 ng mL^{-1}) e alta (500 ng mL^{-1}) foram descongeladas a temperatura ambiente e mantidas nessa temperatura durante 12 horas (baseado no tempo em que as amostras do estudo foram mantidas à temperatura ambiente) e analisadas empregando a LPME na preparação das amostras.

Os resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas e analisados pelo método do Teste *t* student, $p \leq 0,05$.

3.4.7. Estudo de racemização

Após definida a estabilidade da *rac*-mirtazapina, a etapa seguinte foi avaliar a possibilidade de ocorrer inversão quiral durante o processamento das amostras. Para tanto, três amostras de plasma fortificadas com $25 \text{ }\mu\text{L}$ de soluções de cada enantiômero puro foram submetidas a extração e os cromatogramas foram comparados com aqueles obtidos de três amostras de soluções-padrão dos enantiômeros isolados não submetidas a extração. Cada enantiômero foi obtido através da coleta individual na saída do detector, após análises cromatográficas sucessivas de soluções-padrão da mistura racêmica do fármaco mirtazapina em alta concentração. Após essa etapa, as frações coletadas, contendo os enantiômeros puros, foram evaporadas, sob fluxo de ar comprimido, e dissolvidas em 1 mL de metanol.

3.5. Aplicação dos métodos no estudo de disposição cinética

Para verificar a eficiência e aplicabilidade dos métodos de separação e quantificação dos enantiômeros da mirtazapina previamente desenvolvidos e validados, efetuou-se um estudo piloto de avaliação da disposição cinética estereosseletiva com um voluntário sadio, do sexo masculino, com idade de 25 anos e 79 kg de peso. O experimento foi conduzido da seguinte forma: uma dose do medicamento (30 mg de mirtazapina) de nome comercial Remeron[®], da indústria farmacêutica Organon, foi administrada, logo pela manhã, após 12 horas de jejum. Após a administração do fármaco, amostras de 5 mL de sangue foram coletadas em tubos heparinizados, seguida pela separação imediata do plasma por centrifugação durante 10 minutos a 2000 x g, armazenamento em tubos tampados, protegidos do contato direto da luz e conservados sob refrigeração a -20 °C até sua análise. As amostras de plasma foram coletadas nos tempos de 0; 1; 2; 3; 5 e 12 horas.

Uma amostra de plasma também foi coletada no estado de equilíbrio (imediatamente antes da administração do fármaco) de uma paciente do sexo feminino com 40 anos e 65 kg de peso, sob tratamento de depressão. Nesse caso, a amostra foi tratada de forma semelhante às amostras coletadas para o indivíduo sadio.

Os voluntários, previamente informados e esclarecidos acerca do estudo, consentiram, por escrito, em participar do trabalho, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo, processo número 19-CEP/FCFRP) (Anexo 1).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação do comprimento de onda para detecção

Através da avaliação de um espectro de absorção foi possível determinar o comprimento de onda em que o fármaco de interesse absorve mais energia. As medidas de absorção na região do ultravioleta e do visível foram estabelecidas no intervalo de 200 a 800 nm e demonstram que a mistura racêmica absorve intensamente no comprimento de onda equivalente a 292 nm (Figura 11).

Figura 11. Espectro de absorção na região do UV-Visível do composto *rac*-mirtazapina; solução preparada em metanol na concentração de 1 mg mL⁻¹.

4.2. Avaliação das colunas quirais

Nesta etapa do trabalho foram avaliadas diversas colunas quirais visando obter a melhor separação dos enantiômeros da mirtazapina e avaliar, por análise comparativa dos tempos de retenção, as possíveis interferências dos metabólitos desmetilmirtazapina e 8-hidroximirtazapina. Na avaliação das diversas fases móveis usadas nas colunas quirais foi necessário considerar também que, além de separar os enantiômeros, a fase móvel escolhida deveria conduzir a uma eluição rápida o suficiente para não tornar a análise excessivamente longa. Os tempos de retenção dos enantiômeros da mirtazapina também não poderiam ser excessivamente curtos, para evitar uma coeluição com os interferentes endógenos presentes no plasma, pois estes normalmente são detectados nos primeiros minutos da análise.

Na escolha da coluna e fase móvel mais adequadas para a separação dos enantiômeros da mirtazapina foram avaliadas várias fases estacionárias quirais baseadas em proteínas (Ultron ES-OVM e Chiral AGP) e derivados de polissacarídeos (Chiralpak AD-RH, Chiralcel OB-H, Chiralcel OD-H, Chiralcel OJ, Chiralcel OG, Chiralcel OF, Chiralpak AD e Chiralpak AS). As três primeiras colunas foram avaliadas em condições de fase reversa usando misturas de solução tampão e acetonitrila, etanol, isopropanol ou metanol como fase móvel. As outras sete colunas foram avaliadas sob condições de fase normal, usando hexano:isopropanol ou hexano:etanol. A dietilamina foi adicionada a essas fases móveis com o objetivo de reduzir a interação do fármaco básico com os grupos silanóis do suporte de sílica.

4.2.1. Coluna Ultron-ES-OVM

As fases móveis avaliadas na coluna Ultron-ES-OVM estão listadas na Figura 12. Ao reduzir a proporção de acetonitrila, observou-se um aumento nos tempos de retenção e, conseqüentemente, uma melhora significativa na separação dos enantiômeros do fármaco de interesse. Nessas condições, os enantiômeros foram eluídos num tempo inferior a 15 minutos, o que pode ser considerado um tempo de análise adequado. Este resultado encontra-se representado na Figura 12.

Figura 12. Separação dos enantiômeros da mirtazapina na coluna Ultron-ES-OVM.

* fase móvel empregada para a separação ilustrada.

4.2.2. Coluna Chiral AGP

Analizando as fases móveis descritas na Figura 13, verificou-se que praticamente todos os parâmetros empregados para otimizar a resolução quiral foram alterados, mantendo-se unicamente constante a concentração do tampão. A substituição do solvente orgânico isopropanol por outro de maior poder de retenção, acetonitrila, levou a uma separação parcial dos picos. Variações na proporção da acetonitrila conduziram a uma boa separação dos enantiômeros da mirtazapina mas, com tempos de retenção muito elevados, resultando em picos extremamente alargados. Variações no pH da fase móvel contendo

acetonitrila, levaram a uma nova coeluição dos picos. O melhor resultado está representado na Figura 13.

Figura 13. Separação dos enantiômeros da mirtazapina na coluna Chiral AGP.

*fase móvel empregada para a separação ilustrada.

4.2.3. Coluna Chiralpak AD-RH

A Figura 14 mostra as fases móveis usadas, com as quais foi possível obter uma resolução parcial dos enantiômeros da mirtazapina. Uma redução na proporção de acetonitrila forneceu picos mais separados, mas com elevados tempos de retenção; conseqüentemente, as bases dos picos apresentaram-se alargadas, prejudicando a detecção de baixas concentrações, além de tornar a análise mais demorada. Uma redução na concentração do tampão também foi avaliada mas sua influência na separação foi insignificante. O melhor resultado obtido está representado na Figura 14.

Condições cromatográficas

Tampão borato de sódio 20 mmol L⁻¹, pH 9,2: acetonitrila
(50:50, v/v), vazão de 1,0 mL min⁻¹;

*Tampão borato de sódio 20 mmol L⁻¹, pH 9,2: acetonitrila
(70:30, v/v), vazão de 0,8 mL min⁻¹;

Tampão borato de sódio 10 mmol L⁻¹, pH 9,2: acetonitrila
(50:50, v/v), vazão de 1,0 mL min⁻¹.

Detecção em 292 nm

Figura 14. Separação dos enantiômeros da mirtazapina na coluna Chiralpak AD-RH.

* fase móvel empregada para a separação ilustrada.

4.2.4. Coluna Chiralcel OG

As fases móveis avaliadas na coluna Chiralcel OG estão descritas na Figura 15 e conduziram a excelentes separações dos enantiômeros da mirtazapina com tempos de retenção também adequados.

Condições cromatográficas

*Hexano : etanol (98:2, v/v) + dietilamina

(0,1%, v/v), vazão de 1,5 mL min⁻¹;

Hexano : isopropanol (98:2, v/v) + dietilamina

(0,1%, v/v), vazão de 1,5 mL min⁻¹.

Detecção em 292 nm

Figura 15. Separação dos enantiômeros da mirtazapina na coluna Chiralcel OG.

*fase móvel empregada para a separação ilustrada.

4.2.5. Coluna Chiralcel OJ

As fases móveis avaliadas na Coluna Chiralcel OJ estão listadas na Figura 16. As fases móveis contendo o solvente etanol apresentaram uma boa resolução quiral da mirtazapina com tempos de retenção adequados. Uma alteração no tipo de álcool usado

como fase móvel conduziu a uma separação inadequada dos enantiômeros da mirtazapina. Uma redução na concentração de dietilamina levou a um discreto alargamento dos picos. O melhor resultado obtido está representado na Figura 16.

Figura 16. Separação dos enantiômeros da mirtazapina na coluna Chiralcel OJ.

* fase móvel empregada para a separação ilustrada.

4.2.6. Coluna Chiralpak AD

A Figura 17 descreve a fase móvel avaliada na coluna Chiralpak AD que resultou em ótima separação dos enantiômeros da mirtazapina, além de excelentes tempos de retenção.

Figura 17. Separação dos enantiômeros da mirtazapina na coluna Chiralpak AD.

4.2.7. Colunas Chiralcel OF, Chiralcel OD-H, Chiralcel OB-H e Chiralpak AS

As fases móveis avaliadas nessas colunas estão listadas na Tabela 2. Nenhuma das fases descritas apresentou resultados adequados para a resolução dos enantiômeros da mirtazapina, não tendo sido observadas diferenças significativas na resolução quiral após alteração na concentração do álcool presente na fase móvel, bem como na concentração da dietilamina.

4.3. Análise comparativa das colunas quirais

Optou-se pela separação dos enantiômeros da mirtazapina empregando fases estacionárias quirais, apesar (i) do elevado custo das colunas, (ii) da relativa variabilidade entre colunas com o mesmo seletor quiral em comparação com as colunas aquirais (provavelmente relacionado a maior complexidade química natural das CSP), (iii) da tendência a uma menor eficiência que as colunas usadas em HPLC convencional (o que corresponde a menor probabilidade de arranjo ótimo entre os grupos funcionais da CSP e o analito durante as interações enantioseletivas, necessárias para a resolução quiral) e (iv) da dificuldade de prever a fase móvel adequada (normalmente se baseia em experimentos empíricos) (Anová; Dutta, 1999). Por outro lado, os métodos empregando essas fases estacionárias quirais não requerem uma etapa prévia de derivação com risco de racemização e, embora não seja tão econômico, é mais barato e de fácil manuseio que a adição de reagentes quirais na fase móvel.

Tabela 2. Fases móveis avaliadas nas colunas Chiralcel OF, Chiralpak AS, Chiralcel OD-H e Chiralcel OB-H

Fase Móvel	Vazão (mL min⁻¹)
Chiralcel OF	
Hexano : etanol (98:2, v/v) + dietilamina (0,1%, v/v)	1,5
Hexano : isopropanol (98:2, v/v) + dietilamina (0,1%, v/v)	1,5
Chiralpak AS	
Hexano : etanol (98:2, v/v) + dietilamina (0,1%, v/v)	1,5
Hexano : isopropanol (98:2, v/v) + dietilamina (0,1%, v/v)	1,5
Chiralcel OD-H	
Hexano : etanol (98:2, v/v) + dietilamina (0,1%, v/v)	1,5
Hexano : isopropanol (98:2, v/v) + dietilamina (0,1%, v/v)	1,5
Hexano + dietilamina (0,1%, v/v)	1,5
Chiralcel OB-H	
Hexano : etanol (98:2, v/v) + dietilamina (0,1%, v/v)	1,5
Hexano : etanol (99:1, v/v) + dietilamina (0,01%, v/v)	1,5
Hexano : etanol (90:10, v/v) + dietilamina (0,1%, v/v)	1,5
Hexano : etanol (70:30, v/v) + dietilamina (0,1%, v/v)	1,2

Assim, embora a escolha da melhor coluna e condições cromatográficas para a separação dos enantiômeros tenha sido um pouco trabalhosa, foram obtidos cromatogramas com parâmetros cromatográficos bastante satisfatórios. Nas colunas com fases protéicas, devido a elevada complexidade de suas estruturas, os mecanismos de reconhecimento quiral não são totalmente conhecidos e a escolha das condições para separações cromatográficas estereosseletivas são mais ou menos empíricas. Apesar disso, não há dúvidas de que esteja baseado em princípios de bioafinidade, incluindo interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas, interações entre grupos polares e efeitos estéreis (Okamoto; Kaida., 1994; Yashima; Okamoto, 1995). Embora essas colunas possam ser usadas com eluentes aquosos, esse limitado conhecimento do mecanismo de

reconhecimento, a tendência em perder a enantiosseletividade durante o uso em aplicações bioanalíticas (devido a contaminação remanescente pelos componentes da matriz), a baixa capacidade e eficiência moderada das colunas, contribuíram para a escolha da CSP baseada em outro seletor quiral, mais especificamente nos derivados de polissacarídeos (Anová; Dutta, 1999).

As colunas quirais Chiralcel OD-H, Chiralcel OF, Chiralcel OJ, Chiralcel OB-H, Chiralcel OG, Chiralpak AD, Chiralpak AD-RH e Chiralpak AS são obtidas a partir da incorporação de polímeros helicoidais derivados de celulose e amilose em partículas de sílica. Nessas colunas, a discriminação quiral acontece devido às interações dos enantiômeros com as camadas das hélices dos polímeros, além de interações específicas com os grupos introduzidos na derivação do polissacarídeo.

A Tabela 3 mostra as condições cromatográficas ótimas para as colunas quirais que conseguiram resolver os enantiômeros da mirtazapina e os parâmetros cromatográficos fator de retenção (k), fator de separação (α), número de pratos (N) e resolução (R_s) para cada coluna. Estes parâmetros possibilitam uma análise comparativa mais precisa e confiável da capacidade dessas colunas em separar os enantiômeros da mirtazapina, mostrando que o desempenho da coluna Chiralpak AD foi notadamente melhor.

Os cromatogramas da Figura 18 mostram que, também foram obtidas separações com tempos de retenção relativamente curtos, e livres de interferência dos compostos endógenos do plasma. Nessas condições, os metabólitos N-desmetilmirtazapina e 8-hidroxi-mirtazapina eluem com tempo de retenção ≥ 30 minutos, não interferindo com a determinação da mirtazapina.

Entre as demais colunas quirais avaliadas que permitiram a separação dos enantiômeros da mirtazapina, somente a coluna Chiralcel OG apresentou separação total dos enantiômeros com picos finos e valores de eficiência e resolução considerados adequados. Entretanto, os baixos valores de tempo de retenção, mostrados no cromatograma da Figura 15, levaram a uma coeluição do analito com os componentes endógenos da matriz plasmática e, portanto, durante a etapa de aplicação do método em amostras biológicas não houve separação significativa do fármaco presente em amostras fortificadas de plasma, mesmo após tentativas de otimização da técnica de extração.

Tabela 3. Otimização das condições cromatográficas para a separação quiral da mirtazapina.

Fase Móvel	N	R_s	F	K₁	α	As
<i>Chiralpak AD</i>						
Hexano: Etanol (98:2, v/v) + dietilamina (0,1%, v/v)	4010	1,8	1,5	3,4	1,2	1,1
<i>Chiralcel OG</i>						
Hexano: Etanol (98:2, v/v) + dietilamina (0,1%, v/v)	2153	1,8	1,5	1,8	1,1	1,2
<i>Chiralcel OJ</i>						
Hexano: Etanol (98:2, v/v) + dietilamina (0,1%, v/v)	1600	0,9	1,5	2,0	1,1	1,1
<i>Ultron-ES-OVM</i>						
Fosfato de sódio 70 mmol L ⁻¹ , pH 4,8: Acetonitrila (95:5, v/v)	563	1,7	1,0	4,4	1,4	2,0
<i>Chiral AGP</i>						
Acetato de amônia 10 mmol L ⁻¹ , pH 5,5: Acetonitrila (95:5, v/v)	762	1,2	1,0	27,1	1,2	1,4
<i>Chiralpak AD-RH</i>						
Borato de sódio 20 mmol L ⁻¹ , pH 9,2: Acetonitrila (70:30, v/v)	416	0,9	1,0	12,3	1,1	1,5

N, número de pratos; R_s, resolução; F, vazão (mL min⁻¹); k₁, fator de retenção para o primeiro enantiômero eluído (t_m foi definido como o primeiro distúrbio significativo da linha de base, correspondendo ao tempo de retenção de um soluto não retido); α, fator de separação; As, fator de assimetria para o primeiro enantiômero eluído.

4.4. Otimização dos parâmetros de extração Líquido-Líquido

Essa técnica consiste basicamente na partição do analito entre dois líquidos imiscíveis, sendo normalmente, um deles constituído de uma matriz aquosa e o outro é representado por um solvente extrator orgânico. Esse solvente extrator deve ser capaz de extrair seletivamente o analito da matriz, impedindo a passagem dos demais componentes para a fase orgânica, e ser facilmente evaporado após a separação do analito da matriz. Por ser considerada uma técnica de extração relativamente simples e versátil, que não exige uma aparelhagem complexa ou de difícil manuseio, a LLE foi escolhida para uma análise comparativa com a técnica de LPME para a análise enantiosseletiva da mirtazapina presente em amostras complexas de plasma.

A LLE é influenciada pelo tipo de solvente extrator, pH da fase aquosa e razão volumétrica entre as fases orgânica-aquosa (Mcdowall, 1989; Peng; Chiou, 1990). Assim sendo, os principais parâmetros otimizados na etapa de avaliação da LLE foram o tipo de solvente extrator e o pH da fase aquosa.

4.4.1. Solvente orgânico

Entre os solventes orgânicos avaliados, o tolueno foi o único capaz de extrair o analito da matriz e resultar em cromatogramas livres de interferentes endógenos no intervalo de tempo referente a eluição dos enantiômeros do fármaco (Figura 18A), com valores de recuperação considerados satisfatórios para análise de fármacos em amostras complexas de fluidos biológicos (Figura 18B). Os demais solventes orgânicos avaliados (diclorometano, hexano, isopropanol e éter isopropílico), sob as mesmas condições de

análise, não foram capazes de eliminar a interferência de componentes endógenos e/ou, até mesmo, de extrair o analito da matriz plasmática.

Figura 18. Cromatogramas referentes ao plasma branco (A); plasma fortificado com $12,5 \text{ ng mL}^{-1}$ de (+)-(S)-mirtazapina (1) e (-)-(R)-mirtazapina (2) (B); amostra de plasma de um paciente coletada 8 horas após administração oral de 30 mg do racemato (C). As análises foram realizadas empregando uma coluna Chiralpak AD e usando hexano:etanol (98:2, v/v) mais 0,1% de dietilamina na vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, $\lambda = 292 \text{ nm}$; amostras tratadas por LLE.

4.4.2. Ajuste do pH da matriz

Na LLE, o pH das amostras é considerado um fator determinante na etapa de otimização e na escolha desse pH, devem ser levados em consideração a estabilidade e o caráter ácido-base do analito, uma vez que, para que haja uma extração ótima, o fármaco deve se encontrar na forma não dissociada, e assim permitir sua partição no solvente orgânico. Com essa finalidade foi proposta a alcalinização das amostras com $100 \text{ }\mu\text{L}$ e/ou $200 \text{ }\mu\text{L}$ de hidróxido de sódio $1,0$ e/ou 10 mol mL^{-1} . As soluções de hidróxido de sódio apresentaram alta eficácia na remoção dos interferentes endógenos, mas variações na quantidade e concentração dessas soluções resultaram apenas em ligeira melhora na

remoção dos interferentes. Sendo assim, 100 μL de uma solução de hidróxido de sódio 10 mol mL^{-1} foi escolhida para garantir que todo o fármaco se encontrasse na forma não dissociada. Na avaliação do pH, o tolueno foi utilizado como solvente de extração sob as condições cromatográficas previamente estabelecidas para esse método.

Os parâmetros de tempo e potência de agitação, bem como o volume da fase orgânica foram padronizados seguindo protocolos de extração desenvolvidos em nosso laboratório para a análise de outros fármacos, empregando a técnica de LLE. A Figura 9 ilustra o processo completo de extração empregado.

4.5. Otimização dos parâmetros de microextração em fase líquida

4.5.1. Fibra cilíndrica hidrofóbica

Uma vez que as unidades de extração devem ser hidrofóbicas, compatíveis tanto com as soluções aquosas como com uma grande variedade de solventes orgânicos, o polipropileno é o material usado para a confecção das fibras cilíndricas porosas. Comercialmente disponível com um diâmetro interno de 600 μm , as fibras foram apropriadas para volumes medidos em μL das soluções aceptoras usadas nesse trabalho. As paredes das fibras cilíndricas são relativamente espessas (200 μm), o que simplifica a preparação das unidades de extração. A estabilidade mecânica dessas fibras é excelente, o que facilita sua conexão nas agulhas das microseringas. Poros com tamanhos de 0,2 μm

foram selecionados para garantir uma eficiente microfiltração e a penetração unicamente de moléculas pequenas (analitos) (Figura 19).

Figura 19. Foto ilustrativa mostrando as reais dimensões de uma fibra cilíndrica microporosa de polipropileno com 7,0 cm de comprimento e empregada na LPME (indicada por uma seta).

4.5.2. *Solvente Orgânico*

Uma etapa crucial na otimização do método de extração empregando LPME é a seleção do solvente orgânico mais adequado. A impregnação da fibra com o solvente é da maior importância em LPME uma vez que a extração depende do transporte do analito através dos poros da fibra para o solvente orgânico presente no seu interior (Shen; Lee, 2002).

Em geral, vários solventes imiscíveis em água, apresentando diferentes polaridades devem ser testados. Também é possível o uso de uma mistura desses solventes orgânicos (Shen; Lee, 2002). A escolha do solvente orgânico deve ser baseada em alguns aspectos, tais como: (i) baixa solubilidade em água, para prevenir sua dissolução na fase aquosa, (ii) baixa volatilidade, o que irá restringir a evaporação do solvente durante a extração, (iii) elevada solubilidade para o analito alvo (quando empregada a LPME de duas fases) e (iv)

polaridade semelhante a da fibra de polipropileno, para facilitar sua imobilização nos poros da fibra (Psillakis; Kalogerakis, 2003). Assim sendo, foram avaliados os solventes orgânicos hexano, n-octanol e tolueno como fase aceptora.

Os resultados mostraram que o tolueno foi o solvente de extração mais adequado, uma vez que resultou em recuperações aceitáveis (Figura 20B) e em cromatogramas livres de interferentes endógenos no intervalo de tempo referente a eluição dos enantiômeros do fármaco (Figura 20A). Além disso, comparativamente com os outros solventes testados, o tolueno combina: (i) baixa solubilidade em água e (ii) baixa perda durante a extração, com a (iii) habilidade de ser facilmente imobilizado nos poros da fibra após poucos segundos de contato e (iv) apresentar uma taxa de evaporação sob fluxo de ar comprimido adequada para análises de rotina. Entre os demais solventes orgânicos avaliados, sob as mesmas condições de análise, o n-octanol apresentou um tempo de evaporação sob fluxo de ar comprimido extremamente elevado, prejudicando o tempo total de análise, e o hexano evaporou completamente durante a extração, impossibilitando a recuperação da fase aceptora.

4.5.3. Tempo de extração

Assim como em SPME, a extração dos analitos da matriz para a fase extratora em LPME não é um processo exaustivo e tende a alcançar um equilíbrio ao longo de um tempo considerável, após o qual o fator de enriquecimento não mais aumenta ou aumenta lentamente. Portanto, é indesejável efetuar a extração após o equilíbrio ter sido estabelecido. Por outro lado, é desejável que o tempo de extração seja o mais próximo possível do tempo gasto para a análise cromatográfica (Shen; Lee, 2002). A Figura 21

mostra o perfil de extração para amostras de plasma fortificadas com *rac*-mirtazapina e extraídas durante 15 a 45 min.

Figura 20. Cromatogramas referentes ao plasma branco (A); plasma fortificado com $62,5 \text{ ng mL}^{-1}$ de (+)-(S)-mirtazapina (2) e (-)-(R)-mirtazapina (3) e 500 ng mL^{-1} de (S, R)-mefloquina (1,4) (B); amostra de plasma de um voluntário sadio coletada 2 horas após administração oral de 30 mg do racemato (C). As análises foram realizadas empregando uma coluna Chiralpak AD e usando hexano:etanol (98:2, v/v) mais 0,1% de dietilamina na vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, $\lambda = 292 \text{ nm}$; amostras tratadas por LPME.

O equilíbrio não foi alcançado para os dois enantiômeros da mirtazapina no período estudado. Uma razoável extração da amostra foi obtida com tempo de análise aceitável de 30 min, o qual foi escolhido para os experimentos subsequentes.

4.5.4. Agitação da amostra

A agitação das amostras é rotineiramente aplicada para acelerar a cinética de extração. Como a fase extratora remove os analitos da matriz, a porção da matriz mais próxima da fase extratora torna-se repleta de analitos, e o tamanho dessa camada formada torna-se um fator limitante em termos de tempo da extração para atingir o equilíbrio.

Figura 21. Efeito do tempo de extração na recuperação de 250 ng mL^{-1} de cada enantiômero da mirtazapina. Condições de extração: 25°C ; 7 cm de fibra; 1 mL de plasma, $100 \mu\text{L}$ de NaOH 10 mol L^{-1} e 3,0 mL de água MILLI-Q-PLUS® (Fase doadora); $22 \mu\text{L}$ de tolueno (Fase aceptora). As condições cromatográficas são apresentadas na seção 3.2.2. ($n = 3$ para cada experimento).

Uma agitação eficiente reduz o tamanho dessa camada e a difusão dos analitos através da camada interfacial da fibra cilíndrica é facilitada e, portanto, aumenta a velocidade da extração. Além disso, a agitação melhora a repetibilidade do método de extração (Lord, Pawlinszyn, 2000).

Uma vez que a solução aceptora é confinada no interior da fibra cilíndrica, sem contado direto com a solução doadora sob agitação, a LPME pode tolerar elevadas velocidades de agitação sem prejudicar o sistema extrator, melhorando também a estabilidade das extrações (Zhu *et al.*, 2002).

A literatura afirma que a agitação induzida por uma barra magnética pode provocar contaminação cruzada das amostras bem como, provocar a formação de bolhas de ar que tendem a se aderir na superfície da fibra cilíndrica, acelerando a evaporação do solvente e introduzindo imprecisão nas medições (Pedersen-Bjergaard; Rasmussen, 2000; Shen; Lee, 2002). Embora, não tenha sido diretamente avaliada, a velocidade de agitação empregada

durante a otimização foi mantida constante e não apresentou efeitos significativos nos valores de precisão e exatidão.

4.5.5. Razão volumétrica das fases acceptora e doadora

Em LPME, a recuperação (R) pode ser definida como a quantidade total de analito, em porcentagem, que é transferida para a fase acceptora ao final da extração; a razão entre o volume da fase doadora (V_d) e a fase acceptora (V_{org}) governa a recuperação do analito, de acordo com a expressão:

$$R = \left(\frac{n_{org, final}}{n_{d, inicial}} \right) 100\% = \left(\frac{V_{org}}{V_d} \right) \left(\frac{C_{org, final}}{C_{d, inicial}} \right) 100\%$$

onde, V_{org} e V_d são os volumes das fases acceptora e doadora, respectivamente. $C_{org, final}$ é a concentração final do analito na fase acceptora e $C_{d, inicial}$ é a concentração inicial do analito na amostra (Ugland; Krogh; Reubsaet, 2003). Dessa forma, em geral, a recuperação do método empregando a LPME pode ser aumentada elevando a razão entre o volume da fase acceptora e o volume da fase doadora (V_{org}/V_d) (Ugland; Krogh; Rasmussen, 2000).

Em nossos experimentos, o emprego de HPLC como instrumento analítico permitiu que toda fase acceptora fosse facilmente injetada e analisada, o que potencialmente proporcionou uma redução no limite de detecção. A injeção da fase acceptora no HPLC pode ocorrer de modo direto mas, uma vez que o método analítico já havia sido determinado anteriormente e o objetivo maior desse trabalho é a comparação entre LLE e LPME, optou-se por evaporar a fase acceptora constituída de tolueno e dissolver o resíduo na fase móvel antes da análise cromatográfica. Além disso, a eliminação do tolueno,

solvente que absorve na região do UV, representa uma vantagem adicional desse procedimento. Uma avaliação da estabilidade do fármaco frente a evaporação do solvente extrator empregando ar comprimido e um gás inerte (N_2) comprovaram que o fármaco é estável frente a evaporação empregando ar comprimido (seção 4.6.1.).

Para avaliar a razão volumétrica entre as fases aceptora e doadora, o volume da fase doadora foi mantido constante (4 mL) e o volume do solvente orgânico foi alterado pela mudança no comprimento da fibra usada. No presente estudo, 7,0 cm de comprimento de fibra (correspondente a 22 μ L de fase aceptora, $V_{org}/V_d = 0,0055$) provou ser de fácil manuseio, com excelente estabilidade mecânica e com a melhor eficiência de extração. (Figura 22). Esse comportamento pode ser explicado pelas dimensões limitadas do frasco contendo a fase doadora em que a fibra é mergulhada, o que dificultou o manuseio e a total imersão das fibras com tamanhos superiores a 7,0 cm de comprimento. Aliado a isso, cada unidade de fibra é empregada em uma única extração e seu comprimento é definido manualmente o que pode levar a imprecisões entre extrações consecutivas.

Figura 22. Efeito do comprimento da fibra na recuperação de 250 ng mL⁻¹ de cada enantiômero da mirtazapina. Condições de extração: 25 °C; 30 min; 1 mL de plasma, 100 μ L de NaOH 10 mol L⁻¹ e 3,0 mL de água MILLI-Q-PLUS® (Fase doadora); tolueno (Fase aceptora). As condições cromatográficas são apresentadas na seção 3.2.2. (n = 3 para cada experimento).

4.5.6. *Diluição da amostra*

Os enantiômeros da mirtazapina são extensivamente ligados às proteínas plasmáticas ($\geq 85\%$), o que pode reduzir sua recuperação a partir de fluidos biológicos (Timmer; Sitsen; Delbressine, 2000). A diluição das amostras de plasma é um modo simples de aumentar a recuperação da extração, uma vez que ela pode induzir a ruptura das ligações fracas existentes entre o fármaco e a proteína (Blanchrd, 1981). O perfil de diluição das amostras de plasma para a extração dos enantiômeros da mirtazapina encontra-se representado na Figura 23. Diluições de plasma de 30% com água deionizada provaram ser adequadas para reduzir a viscosidade da matriz e permitir um deslocamento satisfatório no equilíbrio fármaco-proteína. Então, 700 μL de plasma foi selecionado para os experimentos subsequentes.

Para esses experimentos e para os demais apresentados nesse capítulo, optou-se por usar um padrão interno (*rac*-mefloquina), visando diminuir a variação dos resultados. Nesse caso, após a extração, a fase aceptora foi adicionada do padrão interno (500 ng mL^{-1}) e, após evaporação do solvente e dissolução do resíduo na fase móvel, a mesma foi analisada. Nos gráficos relaciona-se a razão de áreas no eixo Y.

4.5.7. *Modificadores orgânicos*

Como já mencionado, as interações fármaco-proteína podem ser as responsáveis por uma baixa recuperação. As ligações fármaco-proteína ocorrem devido a interações iônicas, hidrofóbicas ou mesmo polares.

Figura 23. Efeito de diferentes volumes de plasma na recuperação de 250 ng mL^{-1} de cada enantiômero da mirtazapina. Condições de extração: 25°C ; 30 min; 7 cm de membrana; $150 \mu\text{L}$ de NaOH 10 mol L^{-1} e água MILLI-Q-PLUS[®] até 4 mL (Fase doadora); $22 \mu\text{L}$ de tolueno (Fase aceptora). As condições cromatográficas são apresentadas na seção 3.2.2.. ($n = 3$ para cada experimento).

As interações hidrofóbicas podem ser suprimidas pela adição de alguns solventes orgânicos à matriz contendo o fármaco de interesse. Solventes orgânicos como o metanol tem a habilidade de quebrar essas interações hidrofóbicas e também as polares (McDowall, 1989; Halvorsen; Pedersen-Bjergaard; Rasmussen, 2001). Por outro lado, o metanol pode afetar a distribuição do analito entre a fase aquosa e o solvente orgânico, reduzindo a eficiência da extração. Nossos resultados, usando amostras de plasma adicionadas de 0-20% (v/v) de metanol, estão de acordo com estudos anteriores, nos quais o metanol foi usado como supressor das interações com as proteína no sistema de LPME, mas eles também mostraram que a adição de modificadores orgânicos reduziu a recuperação dos enantiômeros da mirtazapina (Figura 24) (Halvorsen; Pedersen-Bjergaard; Rasmussen, 2001; Ho; Pedersen-Bjergaard; Rasmussen, 2002).

Figura 24. Efeito da adição de metanol na recuperação de 250 ng mL^{-1} de cada enantiômero da mirtazapina. Condições de extração: 25°C ; 30 min; 7 cm de membrana; $700 \mu\text{L}$ de plasma, $150 \mu\text{L}$ de NaOH 10 mol L^{-1} e água MILLI-Q-PLUS[®] até 4 mL (Fase doadora); $22 \mu\text{L}$ de tolueno (Fase aceptora). As condições cromatográficas são apresentadas na seção 3.2.2.. (n = 3 para cada experimento).

4.5.8. Ajuste de pH

O pH da amostra é crucial para a LPME de compostos ácidos e básicos. O ajuste do pH resulta em uma maior razão de distribuição e garante elevados fatores de enriquecimentos e recuperação do analito de interesse (Halvorsen; Pedersen-Bjergaard; Rasmussen, 2001). Ajustes no pH podem aumentar a eficiência da extração, uma vez que tanto o equilíbrio de dissociação quanto a solubilidade de ácidos e bases são diretamente afetados pelo pH da amostra. Para avaliar a influencia do pH da solução aquosa (fase doadora), empregaram-se solução de NaOH 10 mol L^{-1} e soluções tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em diferentes pH. Como observado na Figura 25, comparado com a adição do tampão fosfato, uma recuperação considerável dos enantiômeros do fármaco básico mirtazapina foi obtida em $\text{pH} \geq 13$ após a adição de NaOH. Esse comportamento pode ser explicado não somente pelo elevado valor de pH, mas também devido a um certo grau de desnaturação

protéica induzida pela adição da solução de NaOH, resultando em um maior deslocamento desse fármaco das proteínas. O volume da solução de NaOH 10 mol L⁻¹ foi otimizado e 150 µL foi selecionado para os experimentos posteriores (Figura 26).

Figura 25. Efeito do pH da fase doadora na recuperação de 250 ng mL⁻¹ de cada enantiômero da mirtazapina. Condições de extração: 25 °C; 30 min; 7 cm de fibra; 700 µL de plasma e 3,1 mL de água MILLI-Q-PLUS® ou tampão fosfato (Fase doadora); 22 µL de tolueno (Fase aceptora). As condições cromatográficas são apresentadas na seção 3.2.2. (n = 3 para cada experimento).

Figura. 26. Efeito da adição de diferentes volumes de NaOH 10 mol L⁻¹ na recuperação de 250 ng mL⁻¹ de cada enantiômero da mirtazapina. Condições de extração: 25 °C; 30 min; 7 cm de fibra; 700 µL de plasma e 3,1 mL de água MILLI-Q-PLUS® (Fase doadora); 22 µL de tolueno (Fase aceptora). As condições cromatográficas são apresentadas na seção 3.2.2. (n = 3 para cada experimento).

4.5.9. Força Iônica

O efeito “salting-out” tem sido frequentemente usado em várias técnicas de extração para diminuir a solubilidade dos analitos na fase aquosa e para aumentar sua partição no solvente orgânico. Com esse objetivo, 0 a 20 % (m/v) de NaCl foi adicionado às amostras de plasma humano fortificadas com o analito alvo e então submetidas ao processo de extração. Os resultados mostraram que um aumento na força iônica diminui a eficiência da extração (Figura 27). Esse comportamento já foi descrito anteriormente e pode ser explicado considerando dois processos que ocorrem simultaneamente (Lord; Pawliszyn, 2000; Shen; Lee, 2002). Inicialmente, com o aumento na concentração do sal, o efeito “salting-out” melhora a recuperação dos analitos, entretanto, em competição com esse processo, interações entre as moléculas polares do analito e os íons do sal em solução começam a predominar, reduzindo sua habilidade de deslocar-se para a fase extratora (Lord; Pawliszyn, 2000). Nesse contexto, as amostras de plasma preparadas sem sal foram selecionadas para as extrações subsequentes, uma vez que isto resultou em maiores recuperações.

4.5.10. Múltiplas extrações

Múltiplas extrações são usadas para aumentar a recuperação em LLE, e mais recentemente, em SPME, porém acarretam em redução na simplicidade e aumento no tempo de preparação das amostras (Theodoridis *et al.*, 2004). A transferência de massas é um processo dependente do tempo e é reduzido a medida que o sistema se aproxima das condições de equilíbrio (Psillakis; Kalogerakis, 2003). Portanto, para aumentar a eficiência

da extração, efetua-se diversas extrações da mesma amostra. Então, cada fração coletada em diferentes tempos é combinada e analisada.

Figura 27. Efeito da adição de cloreto de sódio na recuperação de 250 ng mL^{-1} de cada enantiômero da mirtazapina. Condições de extração: 25°C ; 30 min; 7 cm de membrana; $700 \mu\text{L}$ de plasma, $150 \mu\text{L}$ de NaOH 10 mol L^{-1} e $3,1 \text{ mL}$ de água MILLI-Q-PLUS® (Fase doadora); $22 \mu\text{L}$ de tolueno (Fase aceptora). As condições cromatográficas são apresentadas na seção 3.2.2.. ($n = 3$ para cada experimento).

Entretanto, a Figura 28A não mostra um aumento significativo na eficiência das LPME múltiplas em comparação com os resultados apresentados pela LPME em uma única etapa, indicando que esse protocolo deve ser otimizado. Após observar que intervalos de 10 minutos entre as extrações não eram suficientes para produzir um acréscimo significativo na quantidade de fármaco extraído, foram propostos intervalos de 20 minutos entre as extrações, afim de melhorar a sua eficiência, entretanto esse sistema também provou ser ineficaz (Figura 28B). Esses resultados podem ser explicados em decorrência da saturação do solvente orgânico retido nos poros da fibra pelo fármaco. Mesmo renovando o solvente presente no interior da fibra, as moléculas do fármaco dissolvidas no solvente estagnado na fibra dificultam o processo de extração.

O ligeiro aumento encontrado na resposta do instrumento analítico após múltiplas extrações não foi suficiente para justificar um acréscimo de até 4 vezes no volume total de

solvente orgânico empregado nas múltiplas extrações, nem o enorme trabalho que essa técnica exige. Dessa forma, sistemas de LPME em uma única extração de 30 min foram selecionados para subseqüentes experimentos, apresentado adequadas recuperações.

Figura 28. Perfil de múltiplas extrações na recuperação de 250 ng mL^{-1} de cada enantiômero da mirtazapina. Condições de extração: 25°C ; 7 cm de membrana; 700 μL de plasma, 150 μL de NaOH 10 mol L^{-1} e 3,1 mL de água MILLI-Q-PLUS® (Fase doadora); 22 μL de tolueno (Fase aceptora). As condições cromatográficas são apresentadas na seção 3.2.2.. (n = para cada experimento).

4.5.11. Temperatura de extração

Com o aumento da temperatura, os coeficientes de difusão aumentam em resposta à diminuição da viscosidade. Uma vez que os coeficientes de difusão são aumentados o tempo requerido para alcançar o equilíbrio é diminuído. Por outro lado, os coeficientes de

partição para a fase aceptora diminuem, reduzindo a quantidade de fármaco extraído no estado de equilíbrio. Portanto, a velocidade das extrações pode ser melhorada a custa da perda da sensibilidade do método que é diminuída no equilíbrio (Ulrich, 2000). Para avaliar a influência da temperatura na eficiência da extração, amostras de plasma fortificadas com *rac*-mirtazapina foram submetidas a diferentes temperaturas de extração. De acordo com os resultados apresentados na Figura 29 não foi observado um aumento significativo na recuperação dos enantiômeros do fármaco nos intervalos de temperatura avaliados. Dessa forma, as extrações subsequentes foram realizadas a temperatura ambiente (25 °C). Dados da literatura mostram que é possível uma melhora na extração utilizando intervalos de temperatura maiores que os empregados nesse estudo (Lord; Pawliszyn, 2000).

Figura 29. Efeito da temperatura na recuperação de 250 ng mL^{-1} de cada enantiômero da mirtazapina. Condições de extração: 30 min; 7 cm de membrana; 700 μL de plasma, 150 μL de NaOH 10 mol L^{-1} e 3,1 mL de água MILLI-Q-PLUS® (Fase doadora); 22 μL de tolueno (Fase aceptora). As condições cromatográficas são apresentadas na seção 3.2.2.. (n = 3 para cada experimento).

4.5.12. Condições otimizadas da LPME em plasma

A máxima recuperação dos enantiômeros da mirtazapina empregando LPME na preparação das amostras em plasma foi alcançada alcalinizando 700 µL de plasma (previamente centrifugado) com 150 µL de uma solução de NaOH 10 mol L⁻¹ e diluindo essa fase doadora com 3,1 mL de água purificada no sistema MILLI-Q-PLUS®. Sob essas condições, os analitos de interesse foram transportados através do tolueno (solvente extrator) impregnado nos poros de uma fibra oca de polipropileno com 7,0 cm de comprimento, 600 µm de diâmetro interno, 200 µm de espessura e 0,2 µm de tamanho de poros até a fase aceptora presente no interior dessa fibra e constituída com o mesmo solvente orgânico (LPME de duas fases). Durante as extrações a 25° C, amostras fortificadas com *rac*-mirtazapina e padrão interno foram submetidas a agitação constante por 30 minutos. Para cada extração uma nova fibra foi utilizada.

4.6. Outros parâmetros otimizados

Na etapa de otimização dos métodos também foram avaliados parâmetros como o procedimento de secagem usado para evaporação do solvente, procedimento de lavagem do injetor logo após cada análise e procedimento de dissolução dos resíduos obtidos após evaporação.

4.6.1. Procedimento de secagem da fase orgânica

A evaporação do solvente de extração aplicando ar comprimido ou o gás nitrogênio provou que a mirtazapina apresenta uma estrutura estável, não sofrendo qualquer alteração

por possíveis reações de oxidação das suas moléculas. As amostras foram evaporadas sob fluxo de ar comprimido para reduzir o custo em análises de rotina.

4.6.2. Procedimento de lavagem do injetor

Nos experimentos iniciais, após cada injeção da amostra, o injetor era lavado com a fase móvel isenta de dietilamina. No entanto, verificou-se que traços da amostra anteriormente injetada permanecia no injetor, contaminando a amostra analisada na sequência (“carry-over”). Para evitar esse efeito entre injeções consecutivas, adicionou-se dietilamina (DEA) nas concentrações de 0,1% e 0,5% na fase de lavagem do injetor, o que provou ser eficaz para a limpeza do injetor em ambas concentrações avaliadas. Entretanto, 0,1% de DEA foi empregada nos experimentos posteriores por reduzir seu consumo e risco de cristalização no injetor.

4.6.3. Procedimento de dissolução dos resíduos

A dissolução dos resíduos obtidos no procedimento de extração foi otimizada de modo semelhante ao procedimento de lavagem, empregando fase móvel sem dietilamina, fase móvel + 0,1% dietilamina e fase móvel + 0,5% de dietilamina. Uma análise cuidadosa das áreas dos picos ($n = 3$ para cada concentração de DEA)(Tabela 4) dos cromatogramas obtidos, comprovou que também existe uma relação direta entre o grau de recuperação dos enantiômeros e a concentração de DEA na fase de dissolução dos resíduos.

Os injetores foram lavados sob as mesmas condições adotadas para a dissolução dos resíduos, com fase móvel + 0,1% de dietilamina; quantidade suficiente para obter uma boa limpeza do injetor e uma adequada recuperação dos enantiômeros do fármaco. Tomou-se o

cuidado de sempre ao final de cada dia lavar o injetor com a fase móvel sem dietilamina para evitar a permanência de resíduos dessa base.

Tabela 4. Relação entre concentração de DEA na fase de dissolução dos resíduos e as áreas dos picos dos enantiômeros da mirtazapina.

Fase de lavagem (%, n = 3)	(+)-(S)-mirtazapina	(-)-(R)-mirtazapina
	Áreas	
FM s/ DEA	161711	161470
FM + 0,1 DEA	239586	239479
FM + 0,5 DEA	256184	255734

Amostras de plasma fortificadas com 200 ng mL⁻¹ de cada enantiômero e submetidas ao processo de extração. FM; fase móvel.

4.7. Ordem de eluição dos enantiômeros da mirtazapina

Como mencionado na seção 3.3., a ordem de eluição foi determinada de duas formas diferentes. Na primeira, os enantiômeros puros (obtidos por análise semipreparativa nas condições estabelecidas no presente trabalho) foram avaliados usando o procedimento descrito por Dodd; Burrows; Norman (2000). O uso de fase móvel diferente não modificou a ordem de eluição dos enantiômeros da mirtazapina.

Os enantiômeros puros da mirtazapina também foram analisados empregando o detector por dicroísmo circular sob as mesmas condições cromatográficas previamente definidas durante o desenvolvimento do método e os resultados obtidos foram comparados com o espectro de CD apresentados por Moody *et al.* (2002), como mostra a Figura 30.

De acordo com esses resultados concluiu-se que o primeiro enantiômero a eluir é o (+)-(S)-mirtazapina, seguido da (-)-(R)-mirtazapina.

Figura 30. Cromatograma referente a análise da *rac*-mirtazapina empregando detecção CD para detecção em 250 nm e espectro de CD da (+)-(S)-mirtazapina e (-)-(R)-mirtazapina. As condições cromatográficas são apresentadas na seção 3.2.2..

4.8. Validação

A validação inclui todos os procedimentos requeridos para mostrar que um método empregado na determinação da concentração de um analito (ou analitos) presente em matriz biológica é adequado para a aplicação pretendida (Shah *et al.*, 1992). A validação dos métodos analíticos para a quantificação de fármacos e seus metabólitos em amostras biológicas apresenta um papel significativo na avaliação e interpretação de dados cinéticos (bioequivalência e biodisponibilidade) requeridos em estudos

farmacológicos/toxicológicos, clínicos/pré-clínicos e em outras aplicações relativas à investigação e aplicação de novos fármacos (Bressolle Bromet-Petit; Audran, 1996; FDA, 2001).

Os métodos bioanalíticos desenvolvidos e validados pela indústria farmacêutica seguem as normas internacionais estabelecidas por órgãos reguladores como Food and Drug Administration (FDA), UK Medicine Control Agency (MCA) e outros órgãos similares do Canadá, Japão e outros países. Essas agências governamentais regulamentaram que para os métodos cromatográficos usados em aplicações biomédicas é necessário avaliar os seguintes parâmetros analíticos (i) recuperação; (ii) linearidade; (iii) limite de quantificação; (iv) precisão; (v) exatidão; (vi) seletividade e (vii) estabilidade (Causon, 1997).

4.8.1. Linearidade

A linearidade de um método representa a capacidade dele produzir resultados que são diretamente (ou através de uma transformação matemática bem definida) proporcionais à concentração do analito nas amostras, dentro de uma faixa determinada. (Causon, 1997).

Nos métodos cromatográficos de análise, a linearidade pode ser medida usando uma curva analítica, semelhante às descritas nas Figura 31 e Figura 32. A variável independente (x) é a concentração e a variável dependente (y) é a resposta medida em função dos valores de área ou altura dos picos (Bressolle Bromet-Petit; Audran, 1996). A partir da curva analítica é possível determinar as concentrações dos analitos presentes em amostras desconhecidas e definir os demais parâmetros de validação.

Sem um adequado procedimento de calibração, tanto a precisão quanto a exatidão não podem ser obtidas. Assim, para a maioria dos métodos validados, é fundamental encontrar uma correlação linear aceitável entre a concentração plasmática e a resposta do instrumento (Snyder; Kirkland; Glajch, 1998).

Para as análises de fármacos em matrizes biológicas, a curva analítica deve ser preparada na própria matriz biológica fortificada com quantidades conhecidas do fármaco e cobrir toda faixa de concentrações que é esperada para as amostras desconhecidas (FDA, 2001).

A partir da análise estatística de regressão linear dos mínimos quadrados foi possível afirmar que os métodos desenvolvidos são lineares tanto para a LLE como LPME. No intervalo de 5,0 a 625 ng mL⁻¹, o método empregando a LLE apresentou equações típicas das curvas analíticas dadas por $y = -0,7353 + 8,1393x$ e $y = -1,1976 + 7,7961x$ para o (+)-(S)- e (-)-(R)- enantiômero da mirtazapina, respectivamente, e coeficientes de determinação (r^2) = 0,999. Esses resultados estão representados na Figura 31.

Figura 31. Curvas analíticas mostrando a linearidade do método de análise dos enantiômeros da mirtazapina, no intervalo de concentração plasmática de 5,0 a 625 ng de cada enantiômero mL⁻¹. As amostras foram tratadas empregando a LLE.

Por sua vez, o método empregando a LPME, no intervalo de concentrações plasmática de 6,25 a 625 ng mL⁻¹, apresentou equações dadas por $y = 0,0284 + 0,0225x$ e $y = 0,0407 + 0,0228x$ para o (+)-(S)- e (-)-(R)- enantiômero da mirtazapina, respectivamente, e coeficientes de determinação (r^2) = 0,999 (Figura 32).

Figura 32 Curvas analíticas mostrando a linearidade do método de análise dos enantiômeros da mirtazapina, no intervalo de concentração plasmática de 6,25 a 625 ng de cada enantiômero mL⁻¹. As amostras foram tratadas empregando a LPME.

4.8.2. Recuperação

A recuperação absoluta de um método analítico é medida comparando-se a resposta obtida para o analito adicionado e submetido a extração de uma matriz biológica, com a resposta produzida por soluções-padrão não submetidas ao processo de extração (FDA, 2001).

O parâmetro de recuperação é fundamental para avaliar a eficiência do método de extração (Causon, 1997). Os procedimentos de preparação das amostras levam a perda do analito devido à extração incompleta, adsorção, perda de volume ou co-precipitação. Raramente o fármaco pode ser completamente recuperado da matriz biológica, porém essa perda pode ser minimizada pela otimização do processo de extração (Peng; Chiou, 1990).

A precisão e exatidão estão diretamente relacionados com a recuperação. Em muitos casos, baixas recuperações refletem baixas precisões (Hubert *et al.*, 1999). Mas as vezes, boa precisão e exatidão podem ser obtidas por métodos com moderada recuperação, desde que o limite de quantificação necessário possa ser obtido (Peng; Chiou, 1990). Algumas vezes pode ser desejável sacrificar intencionalmente uma alta recuperação para conseguir melhor seletividade com alguns procedimentos de extração (Causon, 1997).

A Tabela 5 mostra que, empregando a LLE, foi possível recuperar os enantiômeros da mirtazapina com valores médios de 96% e CV menores que 10%. O método então provou ser adequado para a extração dos enantiômeros presentes em fluidos biológicos.

Tabela 5. Recuperação média dos enantiômeros da mirtazapina em plasma empregando LLE.

Concentração Plasmática (ng mL⁻¹, n = 3)	(+)-(S)-mirtazapina		(-)-(R)-mirtazapina	
	Recuperação	CV	Recuperação	CV
	(%)	(%)	(%)	(%)
6,25	111,1	3,8	107,1	4,2
12,5	97,5	5,5	97,5	4,8
62,5	94,3	3,4	95,8	3,8
125	88,6	5,3	90,8	5,4
625	99,9	2,2	92,8	3,0
Intervalo (6,25-625)	96,5	9,2	96,8	7,1

n, número de amostras; CV, coeficiente de variação.

Na Tabela 6, que mostra os resultados obtidos com LPME, a recuperação média dos enantiômeros da mirtazapina foi superior a 28%, com valores de CV inferiores a 13,8%, para os dois enantiômeros. Por se tratar de uma técnica de microextração, os valores encontrados mostraram que o método é adequado para a extração dos enantiômeros presentes em fluidos biológicos.

Tabela 6. Recuperação média dos enantiômeros da mirtazapina em plasma empregando LPME.

Concentração Plasmática (ng mL ⁻¹ , n = 3)	(+)-(S)-mirtazapina		(-)-(R)-mirtazapina	
	Recuperação	CV	Recuperação	CV
	(%)	(%)	(%)	(%)
12,5	32,4	7,4	30,2	12,6
62,5	26,8	8,8	27,4	12,0
125	32,3	0,8	32,3	0,4
625	24,5	5,3	24,3	9,3
Intervalo (12,5-625)	29,1	13,4	28,8	13,8

n, número de amostras; CV, coeficiente de variação.

4.8.3. Limite de quantificação

O limite de quantificação é tido como a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (Causon, 1997). Na prática, esse parâmetro pode ser considerado como a menor concentração da curva analítica se:

- ❖ a resposta produzida pelo analito na concentração correspondente ao limite de quantificação for pelo menos cinco vezes maior que a apresentada de amostras de plasma branco;
- ❖ a resposta produzida por cada analito puder ser identificável e reproduzível com uma precisão de 20% e exatidão entre 80-120% (FDA, 2001).

Para o método proposto, empregando a LLE, a menor concentração quantificável do analito que apresenta todos os requisitos acima estabelecidos foi 5,0 ng mL⁻¹, com valores de coeficiente de variação (CV) e erro relativo inferiores a 10% (Tabela 7). Valores de coeficiente de variação (CV) e erro relativo inferiores a $\pm 13,5\%$ foram obtidos para a menor concentração quantificável do analito empregando a LPME e equivalente a 6,25 ng mL⁻¹ (Tabela 8).

4.8.4. *Precisão e exatidão*

Precisão e exatidão determinam o erro da análise e são os critérios mais importantes para a avaliação do desempenho de um método analítico (Peng; Chiou, 1990). A precisão de um método descreve a proximidade das medidas individuais de um analito quando o procedimento é aplicado repetidas vezes para múltiplas alíquotas de um único volume homogêneo da matriz biológica (FDA, 2001). Ela é expressa como a porcentagem do coeficiente de variação (CV%) ou desvio padrão relativo (RSD) das replicatas medidas (Causon, 1997). A exatidão de um método analítico descreve a proximidade entre os resultados obtidos pelo método e os valores reais (concentrações) do analito (FDA, 2001). Seus resultados são expressos em função da porcentagem de erro relativo.

A precisão e exatidão intra-ensaios pode ser definida como a habilidade em repetir a mesma metodologia com o mesmo analista, usando o mesmo equipamento e os mesmos reagentes, em um curto intervalo de tempo. Por sua vez, a habilidade de repetir a mesma metodologia sob condições diferentes é conhecida como precisão e exatidão interensaios (Causon, 1997). A precisão e a exatidão do método foram avaliadas da mesma forma, e utilizando os mesmos dados para os cálculos estatísticos.

Os ótimos valores de precisão e exatidão das análises estão sumarizados nas Tabela 7 e 8. Como mostrado na Tabela 7, com o emprego da LLE, os coeficientes de variação da precisão intra-ensaio para todos os compostos foram menores que 3,8% e todos os CV para os estudos interensaios foram inferiores a 10,3%. Essa Tabela também traz os valores de exatidão intra e interensaios para todos os compostos.

Por sua vez, a Tabela 8, que mostra os dados do método que emprega a LPME como técnica de preparação de amostras, apresenta coeficientes de variação da precisão

intra-ensaio para todos os compostos menores que 13,5% e todos os CV para os estudos interensaios foram inferiores a 7,7%, bem como, valores de exatidão intra e interensaios para todos os compostos inferiores a 13,2%.

Tabela 7. Precisão, exatidão e limite de quantificação para análise dos enantiômeros da mirtazapina em plasma empregando LLE.

Concentração Nominal (ng mL ⁻¹)	Concentração analisada (ng mL ⁻¹)		Exatidão ^a		Precisão ^b	
	(+)-(S)-	(-)-(R)-	(+)-(S)-	(-)-(R)-	(+)-(S)-	(-)-(R)-
Intra-ensaio (n = 5) ^c						
5,0 ^d	5,0	4,5	0,0	-10,0	10,7	9,0
10	9,9	10,1	-1,0	1,0	3,0	3,1
50	50,2	51,9	0,4	3,8	2,1	3,0
250	252,5	263,6	1,0	5,4	2,2	3,8
Interensaios (n = 4) ^e						
10	9,3	9,6	-7,0	-4,0	5,0	10,3
50	47,6	48,3	-4,8	-3,4	4,6	6,1
250	239,1	242,9	-4,3	-2,8	4,0	4,7

^a expresso como erro relativo; ^b expresso como coeficiente de variação; ^c número de amostras; ^d limite de quantificação; ^e número de dias.

4.8.5. Seletividade

A seletividade ou especificidade de um método analítico representa a sua capacidade em diferenciar e quantificar o analito na presença de produtos de degradação, de metabólitos e de fármacos co-administrados (FDA, 2001; Causon, 1997). Caso a seletividade não seja garantida, os parâmetros exatidão, precisão e linearidade serão seriamente comprometidos (Snyder, Kirkland; Glajch, 1997).

Tabela 8. Precisão, exatidão e limite de quantificação para análise dos enantiômeros da mirtazapina em plasma empregando LPME.

Concentração Nominal (ng mL ⁻¹)	Concentração analisada (ng mL ⁻¹)		Exatidão ^a		Precisão ^b	
	(+)-(S)-	(-)-(R)-	(+)-(S)-	(-)-(R)-	(+)-(S)-	(-)-(R)-
Intra-ensaio (n = 4) ^c						
6,25 ^d	6,9	6,5	10,4	4,0	4,5	12,3
15	14,1	14,1	-6,0	-6,0	7,8	8,9
100	88,5	99,5	-11,5	-0,5	12,8	12,6
500	437,1	497,2	-12,5	-5,6	12,1	13,5
Interensaios (n = 5) ^e						
15	13,8	14,9	-8,0	-0,6	2,3	5,9
100	87,1	94,9	-12,9	-5,1	1,4	6,9
500	433,9	456,9	-13,2	-8,6	0,8	7,7

^a expresso como erro relativo; ^b expresso como coeficiente de variação; ^c número de amostras; ^d limite de quantificação; ^e número de dias.

O processo de preparação da amostra, as condições de separação (coluna e fase móvel) e o sistema de detecção são fatores determinantes da seletividade do método. Devido ao menor custo e maior flexibilidade operacional, a seleção e otimização do processo de preparação da amostra normalmente é o procedimento mais conveniente e eficaz na eliminação de interferentes.

A especificidade foi medida analisando amostras de plasma branco, de plasma fortificado com os metabólitos da mirtazapina e de plasma fortificado com outros fármacos. A seletividade deve ser garantida até níveis de interferência em concentrações equivalentes ao limite de quantificação (FDA, 2001). Embora a determinação e quantificação dos metabólitos demetilmirtazapina e 8-hidroximirtazapina não tenham sido um dos objetivos desse método, sob as condições cromatográficas estabelecidas para a coluna Chiralpak AD, a avaliação dos seus tempos de retenção (≥ 30 minutos para os dois metabólitos) foi fundamental para a aplicação do método na análise de amostras reais.

Os cromatogramas de plasma branco e fortificado com os metabólitos foram livres de picos interferentes na faixa de detecção da mirtazapina, isto é, não foi encontrada nenhuma co-eluição significativa frente aos compostos endógenos. Cromatogramas representativos de amostras de plasma branco, amostras fortificadas e amostras de um voluntário são ilustrados nas Figura 18 e 20.

Nas Tabela 9 e 10 estão sumarizados os resultados da avaliação da seletividade dos métodos de LLE e LPME, respectivamente, em relação a outros fármacos co-administrados. Os métodos provaram ser altamente seletivos para a determinação dos enantiômeros da mirtazapina em plasma, uma vez que os tempos de retenção dos fármacos avaliados, não apresentaram proximidade ou coincidência com os tempos de retenção dos enantiômeros da mirtazapina.

Tabela 9. Avaliação da interferência de alguns fármacos na análise dos enantiômeros da mirtazapina empregando a LLE.

Fármacos	t_R	Fármacos	t_R
Alprazolam	ND	Metoprolol	ND
Atenolol	ND	Mexiletina	ND
Bromazepam	ND	Mirtazapina	9,5/11
Cafeína	ND	N-desmetildiazepam	ND
Clobazam	ND	N-desmetilmirtazapina	58
Disopiramida	19,2/27,0	Pindolol	ND
Fenobarbital	ND	Procainamida	ND
Flunitrazepam	ND	Propranolol	15,0/33,6
Fluoxetina	ND	Salbutamol	ND
8-Hidroximirtazapina	30/35	Triazolam	ND
Imipramina	17,1/19,2	Trimetropim	ND
Lidocaína	17,5/19,6	Verapamil	17,5/19,6

t_R, tempo de retenção em minutos; ND, não detectável pelo método cromatográfico em até 60 minutos.

Tabela 10. Avaliação da interferência de alguns fármacos na análise dos enantiômeros da mirtazapina empregando a LPME.

Fármacos	t_R	Fármacos	t_R
Albendazol	ND	Levomepromazina	13,2/22,5
Amiodarona	ND	Mebendazol	ND
Amitriptilina	ND	Mefloquina	6,6/12,1
Carboximefloquina	ND	Mianserin	4,0/6,2
Cimetidina	ND	Mirtazapina	7,4/8,9
Diazepam	ND	Moclobemida	ND
Etosuximida	ND	Metoprolol	ND
Femproporex	ND	Omeprazol	ND
Fenacetina	ND	Praziquantel	ND
Fenilefrina	ND	Primaquina	ND
Haloperidol	ND	Propoxifeno	ND
Hidrocloroquina	2.5	Terbutalina	ND
Lercalédipina	15,0/17,0		

t_R, tempo de retenção em minutos; ND, não detectável pelo método cromatográfico em até 60 minutos.

4.8.6. Estudo de estabilidade

Muitos fármacos e outros metabólitos são relativamente instáveis e podem degradar em amostras biológicas durante a coleta e processamento das amostras, bem como, durante sua subsequente estocagem, preparação e análise (Peng; Chiou, 1990). A estabilidade dos fármacos em fluidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica, do material e tempo de acondicionamento (FDA, 2001; Resolução-RE nº 899, Anvisa, 2003; Fura *et al.*, 2003). A estabilidade determinada para um tipo de matriz e material de acondicionamento é específica e não pode ser extrapolada para outros materiais (FDA, 2001; Resolução-RE nº 899, Anvisa, 2003).

As condições empregadas nos ensaios de estabilidade reproduziram as reais condições de manuseio e análise das amostras. Foi avaliada a estabilidade do analito nas

amostras deixadas a temperatura ambiente durante 12 horas e após ciclos de congelamento e descongelamento.

Os resultados de estabilidade obtidos após ciclos de congelamento e descongelamento e após as amostras permanecerem à temperatura ambiente foram comparados com os resultados das amostras recém-preparadas e analisados pelo método do teste *t*-student (Tabela 11). Para simplificar a análise, nessa tabela somente os valores de *p* estão presentes. Estes testam a significância estatística de cada um dos parâmetros avaliados e suas interações com as amostras recém-preparadas. Quando *p* é $\leq 0,05$, a etapa de armazenamento e/ou o processos de preparação e/ou análise das amostras tem um efeito estatisticamente significativo frente a determinação enantiosseletiva da *rac*-mirtazapina e do padrão interno, dentro de um nível de 95% de confiança. Como pôde ser visto através do estudo da estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento e estocagem à temperatura ambiente, as mudanças apresentadas durante o desenvolvimento e validação do método enantiosseletivo para a mirtazapina não foram significativas, com valores de *p* $\geq 0,06$ (Tabela 11). De qualquer forma, tomou-se o cuidado de manter as amostras de plasma armazenadas o menor tempo possível, e descongelá-las uma única vez, minutos antes de seu pré-tratamento e análise por HPLC. Outra medida foi deixá-las sobre a bancada (teste de estocagem à temperatura ambiente) o menor tempo necessário para seu processamento. Durante o estudo de estabilidade, todas as amostras de plasma foram pré-tratadas empregando unicamente a LPME.

Tabela 11. Estabilidade dos enantiômeros da mirtazapina em plasma após ciclos de congelamento e descongelamento e após estocagem à temperatura ambiente.

Concentração padrão Nominal (ng mL ⁻¹)	(+)-(S)-mirtazapina valores de <i>p</i> ^a	(-)-(R)-mirtazapina valores de <i>p</i>
<i>Ciclos de congelamento e descongelamento</i>		
(n = 3)		
15	0,12	0,06
500	0,11	0,09
<i>Estocagem à temperatura ambiente</i>		
(n = 3)		
15	0,15	0,85
500	0,08	0,07

^a Analisados pelo método do teste *t*-student com nível de significância $\leq 0,05$;

4.8.7. Estudo de racemização

Certos fármacos, por exemplo, oxazepam e talidomida, sofrem rápida e extensiva racemização química “*in vivo*” tanto que as informações referentes as propriedades biológicas de cada enantiômero devem ser vistas cuidadosamente. Existem significativos casos nos quais o metabolismo de inversão quiral têm grande impacto nas propriedades biológicas dos fármacos. Essas reações constituem as origens do enorme interesse na estereoquímica durante o desenvolvimento de novos fármacos (Caldwell, 1995). A racemização química também pode ser observada nas etapas preliminares a análise, durante a coleta e processamento de amostras recém-preparadas, bem como, durante o armazenamento, processamento e análise de amostras obtidas a partir de soluções-padrão.

Os cromatogramas da Figura 33 mostram que, sob as condições desenvolvidas e validadas, não se evidenciou diferenças significativas entre as soluções-padrão dos enantiômeros da mirtazapina e os enantiômeros puros presentes em plasma e submetidos a

LPME. Dessa forma, é possível afirmar que não ocorreu qualquer nível de inversão quiral durante o armazenamento, processamento e análise dos enantiômeros puros da mirtazapina empregando LPME como etapa de preparação das amostras.

Figura 33. Cromatogramas referentes ao estudo de racemização. (A) corresponde a soluções-padrão dos enantiômeros puros da mirtazapina e (B) corresponde a amostras dos enantiômeros puros da mirtazapina em plasma fortificado. (1) representa o enantiômero (+)-(S)-mirtazapina e (2) o enantiômero (-)-(R)-mirtazapina. As análises foram realizadas empregando uma coluna Chiralpak AD, usando hexano:etanol (98:2, v/v) mais 0,1% de dietilamina na vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, $\lambda = 292 \text{ nm}$; amostras tratadas por LPME.

4.9. Aplicação do método no estudo de disposição cinética

O método desenvolvido e validado foi empregado de duas maneiras distintas. Primeiramente, foi realizada a análise de algumas amostras de plasma coletadas de um paciente sob tratamento crônico com o antidepressivo mirtazapina e, em seguida, de um voluntário sadio após a administração oral de uma única dose da forma *rac*-mirtazapina (Remeron[®]). A Figura 34, obtida na análise das amostras do paciente empregando a técnica LLE, mostra elevada concentração de (-)-(R)-mirtazapina ((-)-(R)-/(+)-(S)- mirtazapina = 1,14). Uma vez que o enantiômero (-)-(R)-mirtazapina é preferencialmente metabolizado

via N-glicuronidação, o qual não é direta e irreversivelmente eliminado do corpo, resulta na liberação da mirtazapina e consequentemente recirculação tardia do composto inalterado. Como consequência, elevadas concentrações do enantiômero (-)-(R)- têm sido encontradas (Timmer; Sitsen; Delbressine, 2000; Delbressine *et al.*, 1998; Dodd; Burrows; Norman, 2000).

Figura 34. Curvas analíticas no intervalo de concentração plasmática de 6,25 a 125 ng mL⁻¹ mostrando o perfil de concentração plasmática dos enantiômeros da mirtazapina 8 horas após a administração oral do fármaco racêmico na concentração de 30 mg mL⁻¹ a um paciente [(+)-(S)- = 21,3 ng mL⁻¹; (-)-(R)- = 23,6 ng mL⁻¹]. As amostras foram tratadas por LLE.

Em contraste, a análise de amostras coletadas de um voluntário sadio (Figura 35), mostrou uma elevada concentração do enantiômero (+)-(S)-. Uma vez que (+)-(S)-mirtazapina é preferencialmente metabolizada via 8-hidroilação, catalisada pela isoenzima CYP2D6. Este resultado está de acordo com a hipótese de que o indivíduo seja um metabolizador lento. Delbressine *et al.* (1998) observou um aumento de 79% nos valores de AUC para (+)-(S)-mirtazapina em metabolizadores lentos.

Figura 35. Perfil concentração plasmática dos enantiômeros da mirtazapina *versus* tempo de administração oral do fármaco racêmico.

Em seguida, a análise de uma única amostra de plasma coletada do mesmo voluntário sadio, e tratada com LPME (Figura 36) mostrou um comportamento semelhante ao apresentado anteriormente, com uma maior concentração de (+)-(S)-mirtazapina ((-)-(R)-/(+)-(S)- mirtazapina = 0,81). Essa razão (-)-(R)-/(+)-(S) < 1 está de acordo com os resultados apresentados por Paus et al., 2004. De acordo com os autores, uma co-administração com inibidores da CPY450 também pode resultar em elevadas concentrações do enantiômero (+)-(S)-.

Figura 36. Curvas analíticas no intervalo de concentração plasmática de 6,25 a 125 ng mL⁻¹ mostrando o perfil de concentração plasmática dos enantiômeros da mirtazapina 2 horas após a administração oral do fármaco racêmico na concentração de 30 mg para um voluntário sadio [(+)-(-S)- = 18,1 ng mL⁻¹; (-)-(-R)- = 12,2 ng mL⁻¹]. As amostras foram tratadas por LPME.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Sob as condições cromatográficas estabelecidas, a coluna Chiralpak AD (derivado de amilose tris[3,5-dimetilfenilcarbamato]) provou ser a mais adequada entre as colunas avaliadas para a resolução dos enantiômeros da mirtazapina presentes em plasma humano. Essa coluna já havia sido anteriormente empregada por Dodd; Burrows; Norman (2000). Nesse trabalho, os autores descrevem a separação dos enantiômeros da mirtazapina usando fase móvel isenta de dietilamina e constituída de hexano:etanol:isopropanol (98:1:1, v/v). A extração em fase sólida foi empregada no tratamento das amostras. O método descrito no presente trabalho usou hexano:etanol (98:2, v/v) como fase móvel mais 0,1% de dietilamina, o que resultou na separação dos enantiômeros com menor tempo de retenção e picos mais estreitos, melhorando a resolução. Durante a etapa de preparação das amostras a LLE foi comparada com uma nova técnica de microextração em membrana (LPME), que consumiu cerca de 95,5% menos solvente orgânico, com um fator de enriquecimento 182 vezes maior (V_d/V_{org}). A LPME resultou em valores de recuperação compatíveis com aqueles apresentados por outras microtécnicas de preparação de amostras (SPME, por exemplo), além de valores de precisão e exatidão adequados. A LLE e a LPME permitiram a determinação da mirtazapina na faixa de concentração entre 5,0-625 ou 6,25-625 ng de cada enantiômero mL^{-1} , respectivamente, valores comparáveis com o trabalho acima citado.

A LPME provou ser um método, rápido, sensível e reprodutível quanto a LLE, com a vantagem de ser uma técnica mais econômica e menos poluente que a primeira, sem risco de “carry-over” entre amostras consecutivas e de fácil automação, o que possibilita o total

aproveitamento da fase aceptora, uma vez que ela pode ser total e diretamente analisada por HPLC, CG ou CE.

REFERÊNCIAS

8. Referências

ALLINGER, N. L.; CAVA, P. M.; DE JONGH, D.C.; JOHNSON, C. R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L. *Organic Chemistry*, 2 ed, New York, Work Publisher, Inc., cap. 6, p. 94-122, 1976.

ANDERSEN, S.; HALVORSEN, T. G.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis, a promising tool for the determination of chiral drugs in biological matrices. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 963, p. 303-312, 2002.

ANOVÁ, C. M.; HUTTA, M. Role of biological matrices during the analysis of chiral drugs by liquid chromatography. *J. Chromatogr B*, Amsterdam, v. 797, p. 91-109, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Genéricos-Legislação-Resolução-RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03.htm>. Acesso em 14 de junho de 2004.

BLANCHARD, J. Evaluation of the relative efficacy of various techniques for deproteinizing plasma samples prior to high-performance liquid chromatographic analysis. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v. 226, p. 455-460, 1981.

BRESSOLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatography and gas chromatographic methods: applications to pharmacokinetics. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 686, p. 3-10, 1996.

CALDWELL, J. Stereochemical determinants of the nature and consequences of drug metabolism. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 694, p. 39-48, 1995.

CALDWELL, J. Importance of stereospecific bioanalytical monitoring in drug development. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 719, p. 3-13, 1996.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 689, p. 175-180, 1997.

COHEN, M.; PANAGIDES, J.; TIMMER, C. J.; HUISMAN, J. A. M. Pharmacokinetics of mirtazapine from orally administered tablets: influence of high-fat meal. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, Geneva, v. 22, p. 103-110, 1997.

CORDERO B. M.; PAVÓN, J. L. P.; PINTO, C. G.; LAESPADA, E. F.; MARTÍNES, R. C.; GONZALO, E. R. Analytical application of membrane extraction in chromatography and electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 902, p. 195-204, 2000.

DALGLEISH, C. E. The optical resolution of aromatic amino-acids on paper chromatograms. *J. Chem. Soc.*, Cambs, v. 137, p. 3940-3942, 1952.

DELBRESSINE, L. P. C.; MOONEN, M. E. G.; KASPERSEN, F. M.; WAGENAARS, G. N.; JACOBS, P. L.; TIMMER, C. J.; PAANAKKER, J. E.; HAL, H.J.M.; VOORTMAN, G. Pharmacokinetics and biotransformation of mirtazapine in human volunteers. *Clin. Drug. Invest.*, Auckland, v. 15, p. 45-55, 1998.

DODD, S.; BURROWS, G. D.; NORMAN, T. R. Chiral determination of mirtazapine in human blood plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 748, p. 439-443, 2000.

ELIEL, E.; WILEN S. H. *Stereochemistry of organic compounds*. 1 ed., New York, John Wiley & Sons, Inc., cap. 1, p. 1-8, 1994.

ELIEL, E.; WILEN S. H. *Stereochemistry of organic compounds*. 1 ed., New York, John Wiley & Sons, Inc., cap. 7, p. 297-440, 1994.

FAWCETT, J.; BARKIN, R. L. Review of the results from clinical studies on the efficacy, safety and tolerability of mirtazapine for the treatment of patients with major depression. *J. Affect. Disor.*, Amsterdam v. 51, p. 267-285, 1998.

FDA. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research, 2001. Disponível em <<http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.fdf>>. Acesso em 14 de junho de 2004.

FURA, A.; HARPER, T. W.; ZHANG, H.; FUNG, L.; SHYU, W. C. Shift in pH of biological fluids during storage and processing: effect on bioanalysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Amsterdam, v. 32, p. 513-522, 2003.

GARERI, P.; FALCONI, U.; FAZIO, P.; DE SARRO, G. Conventional and new antidepressant drugs in the elderly. *Progr. Neurobiol.*, Oxford, v. 61, p. 353-396, 2000.

GILAR, M.; BOUVIER, E. S. P.; COMPTON, B. J. Advances in sample preparation in electromigration chromatographic and mass spectrometric separation methods. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 909, p. 111-135, 2001.

GORDMAN, J. M. Mirtazapine: clinical overview. *J. Clin. Psychiatry*, Memphis, v. 60, p. 9-13, 1999.

GYIMESI-FORRÁS, K.; SZÁSZ, G.; BUDVÁRI-BÁRÁNY, Z.; GERGELY, A.; New data on the sorption properties of α_1 -acid glycoprotein chiral stationary phase. *Chirality*, New York, v. 11, p.212-217, 1999.

HAGINAKA, J.; KAGAWA, C.; MATSUNAGA, H.; Separation of enantiomers on a chiral stationary phase based on ovoglycoprotein VII. Comparison of chiral recognition ability of ovoglycoprotein from chicken and Japanese quail egg whites. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 858, p. 155-165, 1999.

HAGINAKA, J. Protein-based stationary phases for high-performance liquid chromatography enantioseparation. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 906, p. 253-273, 2001.

HAGINAKA, J. Pharmaceutical and biomedical applications of enantioseparations using liquid chromatographic techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Amsterdam, v. 27, p. 357-372, 2002.

HALVORSEN, T. G.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Reduction of extraction times in liquid-phase microextraction. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 760, p. 219-226, 2001.

HE, Y.; LEE, H. K. Liquid-phase microextraction in a single drop of organic solvent by using a conventional microsyringe. *Anal. Chem.*, Washington, v. 69, p. 4634-4640, 1997.

HESSE, G.; HAGEL, R. Chromatographic resolution of racemates. *Liebigs Ann. Chem.*, Deerfield, p. 996-1008, 1976.

HO, T. S.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction comparison with conventional liquid-liquid extraction. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 963, p. 3-17, 2002.

HUBERT, Ph.; CHIAP, P.; CROMMEN, J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; MERCIER, N.; BERVOAS-MARTIN, S.; CHEVALIER, P.; GRANDJEAN, D.;

LAGORCE, P.; LALLIER, M.; LAPARRA, M. C.; LAURENTIE, M.; NIVET, J. C. The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. *Anal. Chem. Acta*, Amsterdam, v. 391, p. 135-148, 1999.

JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. Solvent microextraction into a single drop. *Anal. Chem.*, Washington, v. 68, p. 2236-2240, 1996.

JÖNSSON, J. Å.; MATHIASSEN, L. Liquid membrane extraction in analytical sample preparation. *Trends Anal. Chem.*, Amsterdam, v. 18, p. 318-325, 1999.

JÖNSSON, J. Å.; MATHIASSEN, L. Membrane-based techniques for sample enrichment. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 902, p. 205-225, 2000.

JÖNSSON, J. Å.; ANDERSSON, M.; MELANDER, C.; NORBERG, J.; THORDARSON, E.; MATHIASSEN, L. Automated liquid membrane extraction for high-performance liquid chromatography of ropivacaine metabolites in urine. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 870, p. 151-157, 2000.

LABAT, L.; DALLET, P. ; KUMMER, E.; DUBOST, J. P. Spectrophotometric, spectrofluorimetric, HPLC and CZE determination of mirtazapine in pharmaceutical tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Amsterdam, v. 28, p. 365-371, 2002.

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

MAIER, N. M.; FRANCO, P.; LINDNER, W. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 906, p. 3-33, 2001.

MANDRIOLI, R.; PUCCI, V.; SABBIONI, C.; BARTOLETTI, C.; FANALI, S.; RAGGI, M. A. Enantioselective determination of the novel antidepressant mirtazapine and its active demethylated metabolite in human plasma by means of capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 1051, p. 253-260, 2004.

MA, M.; CANTWELL, F. F. Solvent microextraction with simultaneous back-extraction for sample cleanup and preconcentration: preconcentration into a single microdrop. *Anal. Chem.*, Washington, v. 71, p. 388-393, 1999.

MARIS, F. A .; DINGLER, E.; NIEHUES, S. High-performance liquid chromatographic assay with fluorescence detection for the routine monitoring of the antidepressant mirtazapine and its demethyl metabolite in human plasma. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 721, p. 309-316, 1999.

McDOWALL, R. D. Sample preparation for biomedical analysis. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 492, p. 3-58, 1989.

MERBEL, N. C. Membrane-based sample preparation coupled on-line to chromatography or electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 856, p. 55-82, 1999.

MILLOT, M. C.; Separation of drug enantiomers by liquid chromatography and capillary electrophoresis, using immobilized proteins as chiral selectors. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 797, p. 131-159, 2003.

MOODY, J. D.; FREEMAN, J.P.; FU, P. P.; CERNIGLIA, C. E. Biotransformation of mirtazapine by *cunninghamella elegans*. *Drug Metab. Dispos.*, Baltimore, v. 30, p. 1274-1279, 2002.

MORGAN, P. E.; TAPPER, J.; SPENCER, E. P. Measurement of total mirtazapine and normirtazapine in plasma/serum by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 798, p. 211-215, 2003.

NAMIKOSHI, H.; SHIBATA, T.; NAKAMURA, H.; OKAMOTO, E.; SHIMIZU, K.; TOGA, Y., in: KENNEDY, J. F.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. (Eds), *Wood and cellulose, industrial utilization, biotechnology, structure and properties*, Ellis Horwood, Chichester, p. 611, 1987.

OGUNI, K.; ODA, H.; ICHIDA, A. Development of chiral stationary phases consisting of polysaccharide derivatives. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 694, p. 91-100, 1995.

OKAMOTO, Y.; KAWASHIMA, M.; HATADA, K. Useful chiral packing materials for high-performance liquid-chromatographic resolution of enantiomers – phenylcarbamates of polysaccharides coated on silica-gel. *J. Am. Chem. Soc.*, Washington, v. 106, p. 5357-5359, 1984.

OKAMOTO, Y.; KAIDA, Y. Resolution by high-performance liquid chromatography using polysaccharide carbamate and benzoates as chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 666, p. 403-419, 1994.

OKAMOTO, Y.; YASHIMA, E. Polysaccharide derivatives for chromatographic separation of enantiomers. *Angew. Chem. Int. Ed.*, Weinheim, v. 37, p. 1020-1043, 1998.

PAANAKKER, J. E.; HAL, H. J. M. Capillary gas-chromatographic assay for the routine monitoring of the antidepressant mepirzepine in human-plasma. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v. 417, p. 203-207, 1987.

PAUS, E.; JONZIER-PEREY, M.; COCHARD, N.; EAP, C. B.; BAUMANN, P. Chirality in the new generation of antidepressants. Stereoselective analysis of the enantiomers of mirtazapine, N-demethylmirtazapine, and 8-hydroxymirtazapine by LC-MS. *Ther. Drug Monit.*, New York, v. 26, p. 366-374, 2004.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, Washington, v. 71, p. 2650-2656, 1999.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction and capillary electrophoresis of acid drugs. *Electrophoresis*, Weinheim, v. 21, p. 579-585, 2000.

PENG, G. W.; CHIOU, W. L. Analysis of drugs and other toxic substances in biological samples for pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v. 531, p. 3-50, 1990.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N.; Hollow-fibre liquid-phase microextraction of phthalate esters from water. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 999, p. 145-153, 2003.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N.; Developments in liquid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.*, Amsterdam, v. 22, p. 565-574, 2003.

PTACEK, P.; KLIMA, J.; MACEK, J. Determination of mirtazapine in human plasma by liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 794, p. 323-328, 2003.

QUATTROCCHI, O. A.; ANDRIZZI, S. I. A.; LABA, R. F. Introducción a la HPLC – Aplicación y Práctica. Buenos Aires, Artes Gráficas Farro S. A., cap. 12, p. 301-328, 1992.

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

RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; KROGH, M.; UGLAND, H. G.; GRØNHAUG, T. Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 873, p. 3-11, 2000.

RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.*, Amsterdam, v. 23, p. 1-10, 2004.

ROMIGUIERES, T.; PEHOURCQ, F.; MATOGA, M.; BEGAUD, B.; JARRY, C.; Determination of mirtazapine and its demethyl metabolite in plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Application to management of acute intoxication. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 775, p. 163-168, 2002.

SHAH, P. V.; MIDHA, K.K.; DIGHE, S.; MCGILVERAY, I. J.; SKELLY, J. P.; YACOBI, A.; LAYLOFF, T.; VISWANATHAN, C. T.; COOK, C. E.; McDOWALL, R. D.; PITTMAN, K. A.; SPECTOR, S. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *J. Pharma, Sci.*, Washington, v.81, n.3, p. 309-314, 1992.

SHAMS, M.; HIEMKE, C.; HÄRTTER, S. Therapeutic drug monitoring of the antidepressant mirtazapine and its N-demethylated metabolite in human serum. *Ther. Drug. Monit.*, New York, v. 26, p. 78-84, 2004.

SHEN, G.; LEE, H. K. Hollow fiber-protected liquid-phase microextraction of triazine herbicides. *Anal. Chem*, Washington, v. 74, p. 648-654, 2002.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Basics of Separation. *Practical HPLC method development*, 2º ed., New York, cap. 2, p. 21-57, 1997.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Sample Preparation. In: MAJORS, R.; SLACK, G. (Ed). *Practical HPLC method development*, 2º ed., New York, cap. 4, p. 100-170, 1997.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Chiral Separations. In: KERN, J.; KIRKLAND, K. (Ed). *Practical HPLC method development*, 2º ed., New York, cap. 12, p. 537-613, 1997.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Quantitation (Including trace analysis). *Practical HPLC method development*, 2º ed., New York, cap. 14, p. 643-683, 1997.

SOURI, E.; FARSAM, H.; JAMALI, F. Stereospecific determination of mefloquine in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 700, p. 215-222, 1997.

STEWART, K. K.; DOHERTY, R. F. Resolution of DL-Tryptophan by affinity chromatography on bovine-serum albumin-agarose columns. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Washington, v. 70, p. 2850-2852, 1973.

STÖRMER, E.; MOLTKE, L. L.; GREENBLATT, J. Scaling drug biotransformation data from cDNA-expressed cytochrome P-450 to human liver: a comparison of relative activity factors and human liver abundance in studies of mirtazapine metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v. 295, p. 793-801, 2000.

TACHIBANA, K.; OHNISHI, A. Reversed-phase liquid chromatographic separation of enantiomers on polysaccharide type chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 906, p. 127-154, 2001.

THEODORIDIS, G.; LONTOU, M. A.; MICHPOPOULOS, F.; SUCHA, M.; GONDOVA, T. Study of multiple solid-phase microextraction combined off-line with high performance liquid chromatography: application in the analysis of pharmaceuticals in urine. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v. 516, p. 197-204, 2004.

TIMMER, C. J.; PAANAKKER, J. E.; VRIES, M. V. Mirtazapine pharmacokinetics with two dosage regimens and two pharmaceutical formulation. *Pharma. Res.*, New York, v. 14, p. 98-102, 1997.

TIMMER, C. J.; AD SITSEN, J. M.; DELBRESSINE, L. P. Clinical pharmacokinetics of mirtazapine. *Clin. Pharmacokinet.*, Auckland, v. 38, p. 461-474, 2000.

TUCKER, G. T.; LENNARD, M. S. Enantiomer specific pharmacokinetics. *Pharmac. Ther.*, Oxford, v. 45, p. 309-329, 1990.

UGLAND, H. G.; KROGH, M.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction as a sample preparation technique prior to capillary gas chromatographic-determination of benzodiazepines in biological matrices. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 749, p. 85-92, 2000.

UGLAND, H. G.; KROGH, M.; REUBSAET, L. Three-phase liquid-phase microextraction of weakly basic drugs from whole blood. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 798, p. 127-135, 2003.

ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 902, p. 167-194, 2000.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. *Quim. Nova*, São Paulo, v. 23, p. 523-530, 2000.

YASHIMA, E.; OKAMOTO, Y. Chiral discrimination on polysaccharides derivatives. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, Tokyo, v. 68, p. 3289-3307, 1995.

YASHIMA, E. Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 906, p. 105-125, 2001.

ZHU, L.; EE, K. H.; ZHAO, L.; LEE, H. K. Analysis of phenoxy herbicides in bovine milk by means of liquid-liquid-liquid microextraction with hollow-fiber membrane. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 963, p. 335-343, 2002.

ANEXOS

9. Anexos

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Avenida do Café, s/nº - Fone: (0xx16) 602.4205 - Fax: (0xx16) 633.2336
14040-903 - Ribeirão Preto - SP - Brasil

Of. CEP-FCFRP/USP - 03/2003
kms

Ribeirão Preto, 25 de fevereiro de 2003.

Prezada Senhora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "*Análise enenaiosseletiva da mirtapazina em plasma: comparação de métodos de preparação das amostras*" (processo nº 19 - CEP/FCFRP, apresentado por Vossa Senhoria ao CEP-FCFRP/USP, foi **aprovado** por este Comitê de Ética em Pesquisa em sua 22ª reunião, ocorrida na presente data.

Em atendimento à Resolução 196/86, deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou a sua interrupção.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª Yara Maria Lucisano Valim
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCFRP / USP

Ilma. Sra.
Prof.ª Dr.ª PIERINA SUELI BONATO
Depto. de Física e Química
FCFRP/USP