Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Análise enantiosseletiva da mirtazapina e seus metabólitos: técnicas modernas de microextração e análise e aplicação em estudos de disposição cinética

Fernando José Malagueño de Santana

Ribeirão Preto-SP
2008

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Análise enantiosseletiva da mirtazapina e seus metabólitos: técnicas modernas de microextração e análise e aplicação em estudos de disposição cinética

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Toxicologia.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientado: Fernando José Malagueño de Santana

Orientadora: Pierina Sueli Bonato

Ribeirão Preto-SP
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

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

De Santana, Fernando José Malagueño

Análise enantiosseletiva da mirtazapina e seus metabólitos: técnicas modernas de microextração e análise e aplicação em estudos de disposição cinética. Ribeirão Preto, 2008.

93 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Pierina Sueli Bonato.

1. Mirtazapina. 2. Análise quiral. 3. Técnicas de microextração.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernando José Malagueño de Santana

Análise enantiosseletiva da mirtazapina e seus metabólitos: técnicas modernas de microextração e análise e aplicação em estudos de disposição cinética

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Toxicologia.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Pierina Sueli Bonato

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIAS

Dedico todo meu trabalho ao meu porto seguro, aqueles que sempre estiveram presentes, confiantes, extremamente tolerantes diante de minha eterna intolerância; meu refúgio de paz, meu bem mais precioso: *MINHA FAMÍLIA (meu pai, minha mãe, meu irmão, minha esposa, meu filho e agora minha filha)*,

Aos 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 character, de trabalhador, de bom pai, filho e companheiro, meus mais preciosos amigos, conselheiros e protetores - Se algum dia conseguir ser metade do que eles sempre foram para mim, poderei dizer, sem dúvida alguma, consegui.

À minha esposa,

“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.

Aos meus filhos,

maior estímulo que um pai pode ter, que com um sorriso, um abraço ou um simples olhar torna nossa vida mais leve, nos faz maior; confiantes; felizes. A eles 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,

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 justa

À meus eternos amigos, Vitor, Douglas, Chico, Valderes, 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 enquanto aqui estive. 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, Marcela, Gabi, dona Teresinha, Luiz, Luciana, Stéphânia, Eduardo

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 doutorado.

À Deus,

Pegadas na Areia

Uma noite eu tive um sonho...

Sonhei que estava andando na praia com o Senhor e através do céu, passavam cenas da minha vida.

Para cada cena que passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia: um era meu e o outro era do Senhor.

Quando a última cena passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia e notei que muitas vezes, no caminho da minha vida, havia apenas um par de pegadas na areia.

Notei também que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiosos do meu viver. Isso me aborreceu deveras e perguntei então ao Senhor:

- Senhor, Tu me disseste que, uma vez que resolvi te seguir, Tu andarias sempre comigo, em todo o caminho. Contudo, notei que durante as maiores atribulações do meu viver, havia apenas um par de pegadas na areia. Não compreendo porque nas horas em que eu mais necessitava de Ti, Tu me deixaste sozinho.

O Senhor me respondeu:

- Meu querido filho. Jamais eu te deixaria nas horas de provas e de sofrimento. Quando viste, na areia, apenas um par de pegadas, eram as minhas. Foi exatamente aí que eu te carreguei nos braços.

Autor desconhecido

RESUMO

DE SANTANA, F. J. M. **Análise enantiosseletiva da mirtazapina e seus metabólitos: técnicas modernas de microextração e análise e aplicação em estudos de disposição cinética.** 2008. 93f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A necessidade de metodologias adequadas para análise de fármacos e seus metabólitos em matrizes biológicas complexas levaram a um crescente interesse no desenvolvimento de novas técnicas de preparação de amostras, particularmente as técnicas de microextração, por serem altamente seletivas e requererem o consumo mínimo de solventes orgânicos. Aliado a esses avanços, o emprego de modernas e eficientes tecnologias analíticas, como a eletroforese capilar (CE) e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS-MS), tem resultado em um considerável avanço em qualidade nas metodologias analíticas disponíveis para bioanálises. Dentro desse cenário, destaca-se a utilização dessas técnicas para o desenvolvimento de metodologias enantiosseletivas, permitindo quantificar os enantiômeros de fármacos administrados como racematos. Sendo assim, propusemos o desenvolvimento e a validação de metodologias enantiosseletivas para a análise dos enantiômeros da mirtazapina (MRT) e de seus principais metabólitos em plasma e urina, utilizando a CE e a LC-MS-MS. Para a preparação das amostras foram empregadas a microextração em fase sólida (SPME) e a microextração em fase líquida (LPME). No primeiro método desenvolvido, a LPME foi utilizada para extrair os analitos das amostras de plasma (1 mL), previamente diluídas, alcalinizadas com 3,0 mL de uma solução tampão fosfato 0,5 mol L⁻¹ (pH 8) e adicionadas de 15% (m/v) de cloreto de sódio. Éter n-hexílico e uma solução de ácido acético 0,01 mol L⁻¹ foram utilizados como solvente extrator e fase aceptora, respectivamente. As análises cromatográficas foram feitas em uma coluna Chiralpak AD-RH, empregando acetonitrila:metanol:etanol (98:1:1, v/v/v) mais 0,2% de dietilamina como fase móvel, na vazão de 1 mL min⁻¹. A detecção dos analitos foi conduzida por LC-MS-MS usando um analisador triplo-quadrupolo e ionização por *electrospray* positivo. Nessas condições, foram obtidas recuperações de 18,3 a 45,5%, resposta linear na faixa de concentração de 1,25-125 ng mL⁻¹ e limite de quantificação (LQ) de 1,25 ng mL⁻¹ para todos os enantiômeros avaliados. Posteriormente, a CE e a LPME foram utilizadas para a análise da MRT e seus principais metabólitos em urina. Antes da extração, amostras de urina (1 mL) foram submetidas a hidrólise enzimática a 37 °C por 16 horas. Então, a enzima foi precipitada com ácido tricloroacético, o pH foi ajustado para 8 com uma solução tampão fosfato 0,5 mol L⁻¹ (pH 11) e 10% de NaCl também foi adicionado. Em seguida as amostras foram submetidas a extração de forma similar aquela realizada para as amostras de plasma. As análises eletroforéticas foram obtidas em uma solução tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 2,5) contendo 0,55% (m/v) de carboximetil-β-ciclodextrina (CM-β-CD). O método foi linear na faixa de concentração de 62,5-2500 ng mL⁻¹ para cada enantiômero da MRT e 8-hidroximirtazapina (8-OHM) e 62,5-1250 ng mL⁻¹ para cada enantiômero da desmetilmirtazapina (DMR). O LQ foi 62,5 ng mL⁻¹ para todos os enantiômeros. A SPME também foi utilizada no desenvolvimento de um método para a determinação simultânea do fármaco e seus metabólitos em urina usando CE e LC-MS-MS. Os analitos de interesse foram transferidos da solução aquosa hidrolisada para uma fibra de polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PMDS-DVB) e então foram desorvidos em metanol. As recuperações médias foram de 12 % para os enantiômeros da MRT, 3,8 % para a DMR e 0,72 % para a 8-OHM. O método foi linear na faixa de concentração de 62,5-2500 ng mL⁻¹ com adequado LQ (62,5 ng mL⁻¹) para todos os enantiômeros. A precisão e exatidão foram menores que 15% para todos os métodos desenvolvidos. Além disso, os métodos foram adequadamente aplicados em estudos preliminares de determinação dos enantiômeros da MRT, 8-OHM e DMR em amostras de plasma e urina obtidos após a administração oral de uma dose única de *rac*-MRT a voluntários sadios.

Palavra chave: Mirtazapina, Análise quiral, Técnicas de microextração.

ABSTRACT

DE SANTANA, F. J. M. **Enantioselective analysis of mirtazapine and its metabolites: modern techniques for microextraction and analysis and application to kinetic disposition studies.** 2008. 93f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

The need for appropriate methodology for the analysis of drugs and their metabolites in complex biological matrices led to a growing interest in developing new techniques for sample preparation, particularly microextraction techniques because they are highly selective and require a minimum consumption of organic solvents. Allied to these developments, the employment of modern and efficient analytical technologies, such as capillary electrophoresis (CE) and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS-MS), has resulted in a considerable improvement in quality in the analytical methodologies available for bioanalysis. In this context, it is worth to mention the use of such techniques to develop enantioselective methodologies, allowing the quantification of the enantiomers of drugs administered as racemates. Therefore, we proposed the development and validation of enantioselective methodologies for the analysis of the enantiomers of mirtazapine (MRT) and of its main metabolites in plasma and urine, using the CE and LC-MS-MS. Solid phase microextraction (SPME) and liquid phase microextraction (LPME) were used for sample preparation. In the first method, LPME was used to extract the analytes from plasma samples (1 mL), previously diluted, alkalized with 3.0 mL 0.5 mol L⁻¹ pH 8 phosphate buffer solution and supplemented with 15% (w/v) sodium chloride. N-hexyl ether and 0.01 mol L⁻¹ acetic acid solution were used as solvent extractor and acceptor phase, respectively. The analyses were carried out on a CHIRALPAK AD-RH column and acetonitrile: methanol: ethanol (98:1:1, v / v / v) plus 0.2% of diethylamine was used as mobile phase, at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The detection was performed by LC-MS-MS equipped with a triple-quadrupole analyzer and ionization by electrospray positive. Under these conditions, recoveries were from 18.3 to 45.5%; linear response over the 1.25-125 ng mL⁻¹ concentration range and limit of quantification (LOQ) of 1.25 ng mL⁻¹ for all enantiomers evaluated were obtained. CE and LPME were also used for the analysis of MRT and its main metabolites in urine. Before the extraction, urine samples (1 mL) were submitted to enzymatic hydrolysis at 37 °C for 16 hours, the enzyme was precipitated with trichloroacetic acid, the pH was adjusted to 8 with 0.5 mol L⁻¹ phosphate buffer solution (pH 11) and 10% (w/v) sodium chloride was further added. Then, the LPME extraction was performed according to the procedure previously developed. The electrophoretic analyses were carried out in 50 mmol L⁻¹ phosphate buffer solution (pH 2.5) containing 0.55% (w/v) carboxymethyl- β -cyclodextrin (CM- β -CD). The method was linear over the concentration range of 62.5-2500 ng mL⁻¹ for each MRT and 8-OHM enantiomer and 62.5-1250 ng mL⁻¹ for each DMR enantiomer. The quantification limit (LOQ) was 62.5 ng mL⁻¹ for all the enantiomers. A SPME method was also developed for the simultaneous enantioselective determination of MRT and its metabolites in urine using CE and LC-MS-MS. The target analytes were transferred from the hydrolyzed aqueous solution to the polydimethylsiloxane-divinylbenzene (PMDS-DVB) fiber coating and then desorbed in methanol. The means recoveries were 12 % for the enantiomers of MRT, 3.8 % for DMR and 0.72 % for 8-OHM. The method was linear over the concentration range of 62.5-2500 ng mL⁻¹ with suitable LOQ (62.5 ng mL⁻¹) for all the enantiomers. The precision and accuracy were lower than 15% for all developed methods. Moreover, the methods were successfully employed for the determination of MRT, 8-OHM and DMR enantiomers in plasma and urine samples obtained after oral administration of a single dose of *rac*-MRT to healthy volunteers.

Keywords: Mirtazapine, Chiral analysis, Microextraction techniques.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CONFIGURAÇÃO INSTRUMENTAL DE UM SISTEMA DE CE (KUHN, HOFFSTETTER-KUHN, 1993).....	3
FIGURA 2. DIAGRAMA REPRESENTATIVO DE UM SISTEMA DE LC-MS-MS.	5
FIGURA 3. DESCRIÇÃO ESQUEMÁTICA DOS SISTEMAS DE MICROEXTRAÇÃO SPME (A) E LPME (B).....	6
FIGURA 4. ESTRUTURA DOS ENANTIÔMEROS DA MRT (DODD; BURROWS; NORMAN, 2000).....	9
FIGURA 5. ESQUEMA DA BIOTRANSFORMAÇÃO DA MRT: 1 = 8-HIDROXILAÇÃO SEGUIDA DE CONJUGAÇÃO; 2 = N ⁺ -GLICURONIDAÇÃO; 3 = N-OXIDAÇÃO; 4 = DESMETILAÇÃO SEGUIDA DE CONJUGAÇÃO (DELBRESSINE <i>ET AL.</i> , 1998).....	10
FIGURA 6. ESTRUTURA DOS FÁRMACOS EMPREGADOS COMO PADRÕES INTERNOS (A) HAL E (B) RAC-MIA.	16
FIGURA 7. ESQUEMA DE UM SISTEMA MS-MS NO MODO MRM.	17
FIGURA 8. ESTRUTURA GERAL DE UMA FASE ESTACIONARIA CHIRALPAK AD OU CHIRALPAK ADR-H NO QUAL SE OBSERVA UM SUPORTE DE SÍLICA RECOBERTO COM O DERIVADO DO POLISSACARÍDEO AMIOSE.	19
FIGURA 9. PROCEDIMENTO GENÉRICO DE PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA EMPREGANDO A LLE.	22
FIGURA 10. ESQUEMA ILUSTRATIVO DOS PRINCÍPIOS BÁSICOS DA LPME (A) CORRESPONDE A AMOSTRA DE INTERESSE E (M) CORRESPONDE A MATRIZ BIOLÓGICA.	24
FIGURA 11. ESTRUTURA DO PADRÃO INTERNO LID.....	29
FIGURA 12. ESQUEMA ILUSTRATIVO DOS PRINCÍPIOS BÁSICOS DA SPME. (A) CORRESPONDE A AMOSTRA DE INTERESSE E (M) CORRESPONDE A MATRIZ BIOLÓGICA.	36
FIGURA 13. ESPECTROS DE MASSAS DOS PRODUTOS RESULTANTES DA FRAGMENTAÇÃO DAS MOLÉCULAS PROTONADAS DA 8-OHM, DMR, MRT E HAL.....	39
FIGURA 13, CONTINUAÇÃO. ESPECTROS DE MASSAS DOS PRODUTOS RESULTANTES DA FRAGMENTAÇÃO DAS MOLÉCULAS PROTONADAS DA 8-OHM, DMR, MRT E HAL.....	40
FIGURA 14. SEPARAÇÃO DO (A) HAL E DOS ENANTIÔMEROS DA (B) 8-OHM, (C) MRT E (D) DMR NA COLUNA CHIRALPAK AD-RH. AS ANÁLISES FORAM REALIZADAS EMPREGANDO ACETONITRILA:METANOL:ETANOL (90:5:5, v/v/v) MAIS 0,2% DE DEA, NA VAZÃO DE 1 mL MIN ⁻¹	42
FIGURA 15. CROMATOGRAMAS (DETECÇÃO CD A 253 NM) E ESPECTROS DE CD DA (-)-(R)- E (+)-(S)- DA MRT (A), 8-OHM (B) E DMR (C). AS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS SÃO APRESENTADAS NA SEÇÃO 3.1.2.2....	43
FIGURA 15, CONTINUAÇÃO. CROMATOGRAMAS (DETECÇÃO CD A 253 NM) E ESPECTROS DE CD DA (-)-(R)- E (+)-(S)- DA MRT (A), 8-OHM (B) E DMR (C). AS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS SÃO APRESENTADAS NA SEÇÃO 3.1.2.2.....	44
FIGURA 16. CROMATOGRAMAS MOSTRANDO O EFEITO DA SUPRESSÃO DE IONIZAÇÃO QUANDO AS AMOSTRAS ERAM EXTRAÍDAS POR LLE (A) 8-OHM, (B) MRT, (C) MIA E (D) DMR NA COLUNA CHIRALPAK AD-RH. AS ANÁLISES FORAM REALIZADAS EMPREGANDO ACETONITRILA:METANOL:ETANOL (90:5:5, v/v/v) MAIS 0,2% DE DEA NA VAZÃO DE 1 mL MIN ⁻¹	46
FIGURA 17. FOTO ILUSTRATIVA MOSTRANDO AS REAIS DIMENSÕES DE UMA FIBRA OCA COM 8,0 CM DE COMPRIMENTO E EMPREGADA NA LPME (INDICADA POR UMA SETA).	47
FIGURA 18. EFEITO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO NA RECUPERAÇÃO DE 250 NG DE CADA ENANTIÔMERO ML ⁻¹ DA MRT, DMR E 8-OHM. CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO: 35 °C; FIBRA DE 6 CM; 1 ML DE PLASMA 4 ML DE SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO 0,5 MOL L ⁻¹ PH 8 (FASE DOADORA); ÉTER N-HEXÍLICO (FASE EXTRATORA); 15 µL DE SOLUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL 0,01 MOL L ⁻¹ (FASE ACEPTORA). AS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS SÃO APRESENTADAS NA SEÇÃO 3.1.2.2. (N=3 PARA CADA EXPERIMENTO). .	49
FIGURA 19. EFEITO DO PH DA FASE DOADORA NA RECUPERAÇÃO DE 250 NG DE CADA ENANTIÔMERO ML ⁻¹ DA MRT, DMR E 8-OHM. CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO EM LPME: 25 MIN; 35 °C; FIBRA DE 6 CM; 1 ML DE PLASMA; ÉTER N-HEXÍLICO (FASE EXTRATORA); 15 µL DE SOLUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL 0,01 MOL L ⁻¹ (FASE ACEPTORA); FASE DOADORA: TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO 0,05 MOL L ⁻¹ PH 8; TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO 0,5 MOL L ⁻¹ PH 8; TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO 0,5 MOL L ⁻¹ PH 11. AS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS SÃO APRESENTADAS NA SEÇÃO 3.1.2.2. (N=3 PARA CADA EXPERIMENTO).	51
FIGURA 20. EFEITO DA ADIÇÃO DE METANOL NA RECUPERAÇÃO DE 250 NG DE CADA ENANTIÔMERO ML ⁻¹ DA MRT, DMR E 8-OHM. CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO: 25 MIN; 35 °C; FIBRA DE 6 CM; 1 ML DE PLASMA, 4 ML DE SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO 0,5 MOL L ⁻¹ PH 8 (FASE DOADORA); ÉTER N-HEXÍLICO (FASE EXTRATORA); 15 µL DE SOLUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL 0,01 MOL L ⁻¹ (FASE ACEPTORA). AS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS SÃO APRESENTADAS NA SEÇÃO 3.1.2.2. (N=3 PARA CADA EXPERIMENTO). .	52
FIGURA 21. CURVAS ANALÍTICAS DEMONSTRANDO A LINEARIDADE DO MÉTODO DE ANÁLISE DOS ENANTIÔMEROS DA MRT, DMR E 8-OHM NO INTERVALO DE CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE 1,25 A 125 NG DE CADA ENANTIÔMERO ML ⁻¹	54
FIGURA 22. CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DE (A) PLASMA COLETADO ANTES DA DOSAGEM E (B-E) 4 HORAS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE UMA DOSE ORAL DE 45 MG DA RAC-MRT. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	

APRESENTADAS NA SEÇÃO 3.1.2.2. TODAS AS AMOSTRAS FORAM PRÉ-TRATADAS POR LPME. (B) HAL, (C) 8-OHM, (D) MRT E (E) DMR.	59
FIGURA 23. PERFIL CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DAS FORMAS ENANTIOMÉRICAS MRT E DMR APÓS ADMINISTRAÇÃO ORAL DE 45 MG DE RAC-MRT A UM VOLUNTÁRIO SADIO.	61
FIGURA 24. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CM-B-CD NA RESOLUÇÃO QUIRAL DE MRT, DMR, 8-OHM E LID. CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS COMO APRESENTADAS NA SEÇÃO 3.2.2.5. (A) 0,1% CM-B-CD, (B) 0,55% CM-B-CD AND (C) 0,75% CM-B-CD. (1) (-)-(R)-DMR, (3) (+)-(S)-DMR, (2) (-)-(R)-MRT, (4) (+)-(S)-MRT, (5) (-)-(R)-8-OHM, (6) (+)-(S)-8-OHM E (7) LID.	64
FIGURA 25. ELETROFEROGRAMAS REPRESENTATIVOS DE (A) URINA HUMANA BRANCA; (B) URINA HUMANA FORTIFICADA COM MRT, DMR 8-OHM, NA CONCENTRAÇÃO DE 312,5 NG DE CADA ENANTIÔMERO mL^{-1} E LID NA CONCENTRAÇÃO URINÁRIA DE 1000 NG DE CADA ENANTIÔMERO mL^{-1} ; (C) AMOSTRA DE URINA COLETADA ENTRE 8 A 12 HORAS APÓS A ADMINISTRAÇÃO ORAL DE 45 MG DE RAC-MRT A UM VOLUNTÁRIO SADIO. AS CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS ESTÃO DESCRITAS NA SEÇÃO 3.2.2.5. TODAS AS AMOSTRAS FORAM PRÉ-TRATADAS POR LPME. (1) (-)-(R)-DMR, (3) (+)-(S)-DMR, (2) (-)-(R)-MRT, (4) (+)-(S)-MRT, (5) (-)-(R)-8-OHM, (6) (+)-(S)-8-OHM E (7) LID.	66
FIGURA 26. EFEITO DO TEMPO DE HIDRÓLISE NA FORMAÇÃO DA FRAÇÃO LIVRE DO FÁRMACO E DE SEUS DOIS PRINCIPAIS METABOLITOS EM AMOSTRAS DE URINA HUMANA COLETADAS NO INTERVALO DE 4-8 HORAS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE 45 MG DE REMERON [®] , PRÉ-TRATADAS POR LPME. CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE: 1 mL DE URINA; 0,5 mL DE TAMPÃO FOSFATO 0,5 mol L^{-1} , pH 5; 50 μL DE ENZIMA β -GLICURONIDASE (HP-2); 37,5 °C. AS CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS SÃO APRESENTADAS NA SEÇÃO 3.2.2.5. (N=3 PARA CADA EXPERIMENTO).	68
FIGURA 27. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA USANDO AMOSTRAS DE URINA COLETADAS NO INTERVALO DE 4-8 HORAS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE 45 MG DE REMERON [®] A UM VOLUNTÁRIO SADIO, PRÉ-TRATADAS POR LPME. AVALIAÇÃO DO VOLUME DE SOLUÇÃO ENZIMÁTICA. CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE: 1 mL DE URINA; 0,5 mL DE TAMPÃO FOSFATO 0,5 mol L^{-1} , pH 5; ENZIMA β -GLICURONIDASE (HP-2); 37,5 °C. AS CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS SÃO APRESENTADAS NA SEÇÃO 3.2.2.5. (N=3 PARA CADA EXPERIMENTO).	69
FIGURA 28. CURVAS ANALÍTICAS MOSTRANDO A LINEARIDADE DO MÉTODO DE ANÁLISE DOS ENANTIÔMEROS DA MRT, DMR E 8-OHM NO INTERVALO DE CONCENTRAÇÃO URINÁRIA DE 62,5-2500 NG DE CADA ENANTIÔMERO mL^{-1} DA MRT E 8-OHM E NO INTERVALO DE CONCENTRAÇÃO URINÁRIA DE 62,5-1250 NG DE CADA ENANTIÔMERO mL^{-1} DA DMR. AS AMOSTRAS FORAM PRÉ-TRATADAS EMPREGANDO A LPME.....	71
FIGURA 29. PERFIL QUANTIDADE ACUMULADA EXCRETADA DAS FORMAS ENANTIOMÉRICAS DA MRT, DMR E 8-OHM APÓS A ADMINISTRAÇÃO ORAL DE 45 MG DE RAC-MRT A UM VOLUNTÁRIO SADIO E PRÉ-TRATADAS POR LPME.	75
FIGURA 30. EFEITO DO TIPO DE RECOBRIMENTO NA RECUPERAÇÃO DE MRT, DMR E 8-OHM (6250 NG DE CADA ENANTIÔMERO mL^{-1}) CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO: 22 °C $\pm$ 2; 1 mL DE URINA, 2 mL DE SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO 1 mol L^{-1} , pH 11 (FASE AQUOSA); 30 MIN DE EXTRAÇÃO; 100 μL DE METANOL (SOLVENTE DE DESORÇÃO); 1 MIN DE DESORÇÃO. AS CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS SÃO APRESENTADAS NA SEÇÃO 3.2.2.5. (N=2 PARA CADA EXPERIMENTO).....	76
FIGURA 31. EFEITO DO pH DA AMOSTRA NA RECUPERAÇÃO DA MRT, DMR E 8-OHM (6250 NG DE CADA ENANTIÔMERO mL^{-1}) CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO: 22 °C $\pm$ 2; 1 mL DE URINA, PDMS-DVB (60 μm DE ESPESURA DE RECOBRIMENTO); 30 MIN DE EXTRAÇÃO; 100 μL DE METANOL (SOLVENTE DE DESORÇÃO); 1 MIN DE DESORÇÃO. AS CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS SÃO APRESENTADAS NA SEÇÃO 3.2.2.5. (N=2 PARA CADA EXPERIMENTO).	77
FIGURA 32. EFEITO DA ADIÇÃO DE NaCl NA AMOSTRA NA RECUPERAÇÃO DA MRT, DMR E 8-OHM (6250 NG DE CADA ENANTIÔMERO mL^{-1}). CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO: 22 °C $\pm$ 2; 1 mL DE URINA HUMANA, 2 mL DE SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO 1 mol L^{-1} , pH 11 (FASE AQUOSA); PDMS-DVB; 30 MIN DE EXTRAÇÃO; 100 μL DE METANOL (SOLVENTE DE DESORÇÃO); 1 MIN DE DESORÇÃO. AS CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS SÃO APRESENTADAS NA SEÇÃO 3.2.2.5. (N=2 PARA CADA EXPERIMENTO).	78
FIGURA 33. EFEITO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO NA RECUPERAÇÃO DA MRT, DMR E 8-OHM (6250 NG DE CADA ENANTIÔMERO mL^{-1}) CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO: 22 °C $\pm$ 2; 1 mL DE URINA, 2 mL DE SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO 1 mol L^{-1} , pH 11 (FASE AQUOSA); PDMS-DVB; 100 μL DE METANOL (SOLVENTE DE DESORÇÃO); 1 MIN DE DESORÇÃO. AS CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS SÃO APRESENTADAS NA SEÇÃO 3.2.2.5. (N=2 PARA CADA EXPERIMENTO).	79
FIGURA 34. EFEITO DA TEMPERATURA DE EXTRAÇÃO NA RECUPERAÇÃO DA MRT, DMR E 8-OHM (6250 NG DE CADA ENANTIÔMERO mL^{-1}) CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO: 1 mL DE URINA, 2 mL DE SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO 1 mol L^{-1} , pH 11 (FASE AQUOSA); PDMS-DVB; 100 μL DE METANOL (SOLVENTE DE DESORÇÃO); 30 MIN DE EXTRAÇÃO. AS CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS SÃO APRESENTADAS NA SEÇÃO 3.2.2.5. (N=2 PARA CADA EXPERIMENTO).	79

FIGURA 35. EFEITO DO TEMPO DE DESORÇÃO NA RECUPERAÇÃO DA MRT, DMR E 8-OHM (6250 NG DE CADA ENANTIÔMERO mL^{-1}) CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO: $22\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2$; 1 mL DE URINA, 2 mL DE SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO 1 mol L^{-1} , pH 11 (FASE AQUOSA); PDMS-DVB; 100 μL DE METANOL (SOLVENTE DE DESORÇÃO); 30 MIN DE EXTRAÇÃO. AS CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS SÃO APRESENTADAS NA SEÇÃO 3.2.2.5. (N=2 PARA CADA EXPERIMENTO). 80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. RAZÃO m/z DOS COMPOSTOS PROTONADOS $[M+H]^+$; FRAGMENTO MONITORADO NA TRANSIÇÃO, ENERGIA DE COLISÃO, VOLTAGEM DO CONE E TEMPO DE RETENÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DA 8-OHM, MRT, DMR, MIA E HAL.....	17
TABELA 2. FASES MÓVEIS AVALIADAS PARA A COLUNA CHIRALPAK ADR-H DURANTE A OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRAFICAS EM LC-MS-MS.....	41
TABELA 3. PARÂMETROS CROMATOGRAFICOS OBTIDOS NAS COLUNAS CHIRALPAK AD E CHIRALPAK AD-RH PARA OS ENANTIÔMEROS DA MRT, DMR E 8-OHM.....	42
TABELA 4. RECUPERAÇÃO MÉDIA, LINEARIDADE E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DA MRT, DMR, 8-OHM EM PLASMA EMPREGANDO LPME.....	55
TABELA 5. PRECISÃO E EXATIDÃO INTRA-ENSAIO PARA ANÁLISE DOS ENANTIÔMEROS DA MRT, DMR, 8-OHM EM PLASMA EMPREGANDO A LPME.....	58
TABELA 6. PRECISÃO E EXATIDÃO INTERENSAIOS PARA ANÁLISE DOS ENANTIÔMEROS DA MRT, DMR, 8-OHM EM PLASMA EMPREGANDO A LPME.....	58
TABELA 7. ESTABILIDADE DOS ENANTIÔMEROS DA MRT, DMR E 8-OHM EM PLASMA APÓS CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO E NAS MESMAS CONDIÇÕES TEMPO E ANÁLISE.....	61
TABELA 8. RECUPERAÇÃO MÉDIA, LINEARIDADE E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	71
TABELA 9. PRECISÃO E EXATIDÃO INTRA-ENSAIO PARA A ANÁLISE DOS ENANTIÔMEROS DA MRT, DMR E 8-OHM EM URINA HUMANA.....	72
TABELA 10. PRECISÃO E EXATIDÃO INTERENSAIOS PARA A ANÁLISE DOS ENANTIÔMEROS DA MRT, DMR E 8-OHM EM URINA HUMANA.....	72
TABELA 11. AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE ALGUNS FÁRMACOS NA ANÁLISE QUIRAL DA MRT, DMR, 8-OHM E LID.....	73
TABELA 12. ESTABILIDADE DOS ENANTIÔMEROS DA MRT, DMR E 8-OHM EM URINA HUMANA APÓS CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO E NAS MESMAS CONDIÇÕES DE TEMPO E ANÁLISE.....	74
TABELA 13. RECUPERAÇÃO MÉDIA, LINEARIDADE E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DA MRT, DMR, 8-OHM EM URINA EMPREGANDO SPME.....	81
TABELA 14. PRECISÃO E EXATIDÃO INTRA-ENSAIO PARA ANÁLISE DOS ENANTIÔMEROS DA MRT, DMR, 8-OHM EM URINA EMPREGANDO A SPME.....	81
TABELA 15. PRECISÃO E EXATIDÃO INTERENSAIOS PARA ANÁLISE DOS ENANTIÔMEROS DA MRT, DMR, 8-OHM EM URINA EMPREGANDO A SPME.....	82
TABELA 16. ESTABILIDADE DOS ENANTIÔMEROS DA MRT, DMR E 8-OHM EM URINA APÓS CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO E NAS MESMAS CONDIÇÕES TEMPO E ANÁLISE.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
CE	Eletroforese capilar
EOF	Fluxo eletrosmótico
SiOH	Grupos silanóis ácidos
CZE	Eletroforese capilar em solução livre
EKC	Cromatografia eletrocinética
CD	Ciclodextrinas
LC-MS-MS	Cromatografia líquida-espectrometria de massas
LLE	Extração líquido-líquido
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida
LPME	Microextração em fase líquida
PMDS	Polidimetilsiloxano
DVB	Divinilbenzeno
PA	Poliacrilato
CW-TPR	<i>Carbowax-templated resin</i>
CWX	Carbowax
GC	Cromatografia gasosa
MRT	Mirtazapina
CYP	Citocromo P450
8-OHM	8-Hidroximirtazapina
DMR	Desmetilmirtazapina
EM	Metabolizadores rápidos
PM	Metabolizadores lentos
LQ	Limite de quantificação
DEA	Dietilamina
TFA	Ácido trifluoroacético
HAL	Haloperidol
<i>rac</i> -	racêmica
MIA	Mianserina
ESI	Interface <i>electrospray</i>

MRM	Monitoramento de reações múltiplas
R_s	Resolução
k	Fator de retenção
α	Fator de separação
N	Número de pratos
r^2	Coeficiente de determinação
CV%	Estimativa do desvio padrão relativo
E	Erro relativo
FDA	Food and Drug Administration
HP-2	Helix pomatia Tipo 2
LID	Lidocaína
CM- β -CD	Carboximetil- β -Ciclodextrina
HP- β -CD	2-Hidroxipropil- β -Ciclodextrina
β -CD sulfatada	Sal sódico de β -CD Sulfatada
DC	Deoxicolato de sódio
T_m	Tempo de migração do fármaco
MCA	<i>UK Medicine Control Agency</i>
DPR	Desvio padrão relativo
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária

SUMÁRIO

DEDICATÓRIAS

AGRADECIMENTOS

RESUMO	i
--------------	---

ABSTRACT	ii
----------------	----

LISTA DE FIGURAS	iii
------------------------	-----

LISTA DE TABELAS	vi
------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
--------------------------------------	-----

1. INTRODUÇÃO	1
---------------------	---

1.1. TÉCNICAS DE ANÁLISE ENANTIOSELETIVA	1
--	---

1.1.1. <i>Eletroforese Capilar</i>	2
--	---

1.1.2. <i>Cromatografia líquida-espectrometria de massas (LC-MS-MS)</i>	4
---	---

1.2. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	5
------------------------------------	---

1.2.1. <i>Microextração em fase sólida</i>	6
--	---

1.2.2. <i>Microextração em fase líquida</i>	7
---	---

1.3. PROPRIEDADES ESTEREOSELETIVAS DA MIRTAPAZINA	9
---	---

1.3.1. <i>Análise enantiosseletiva</i>	11
--	----

2. OBJETIVOS	14
--------------------	----

3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
------------------------------	----

3.1. ANÁLISE ENANTIOSELETIVA DE MRT E SEUS METABÓLITOS EM PLASMA MÉTODO LPME/LC-MS-MS	15
---	----

3.1.1. Materiais	15
-------------------------------	----

3.1.1.1. <i>Reagentes e solventes</i>	15
---	----

3.1.1.2. <i>Soluções-padrão</i>	15
---------------------------------------	----

3.1.1.3. <i>Amostras de plasma humano</i>	16
---	----

3.1.1.4. <i>Equipamentos</i>	16
------------------------------------	----

3.1.1.4.1. <i>Sistema cromatográfico</i>	16
--	----

3.1.1.4.2. <i>Equipamentos empregados na preparação das soluções tampão</i>	18
---	----

3.1.1.4.3. <i>Equipamentos empregados na preparação das amostras</i>	18
--	----

3.1.1.5. <i>Colunas com fases estacionárias quirais e coluna de guarda</i>	19
--	----

3.1.2. Métodos	20
-----------------------------	----

3.1.2.1. <i>Avaliação das colunas cromatográficas quirais empregadas em LC-MS-MS</i>	20
--	----

3.1.2.2. <i>Condições cromatográficas para análise enantiosseletiva da mirtazapina e de seus dois principais metabólitos</i>	21
--	----

3.1.2.3. <i>Ordem de eluição</i>	21
--	----

3.1.2.4. <i>Procedimento de preparação da amostra</i>	21
---	----

3.1.2.4.1. <i>Extração líquido-líquido</i>	22
--	----

3.1.2.4.2. <i>Microextração em fase líquida empregando fibras ocas</i>	23
--	----

3.1.2.5. <i>Validação</i>	24
---------------------------------	----

3.1.2.5.1. <i>Curvas analíticas e Linearidade</i>	24
---	----

3.1.2.5.2. <i>Limite de quantificação</i>	25
---	----

3.1.2.5.3. <i>Recuperação</i>	25
-------------------------------------	----

3.1.2.5.4. <i>Precisão (repetibilidade) e exatidão</i>	25
--	----

3.1.2.5.4.1. <i>Precisão e exatidão intra-ensaio</i>	26
--	----

3.1.2.5.4.2. <i>Precisão e exatidão interensaios</i>	26
--	----

3.1.2.5.5. <i>Seletividade (supressão de ionização)</i>	26
---	----

3.1.2.5.6. <i>Estudo de estabilidade</i>	27
--	----

3.1.2.5.6.1. <i>Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento</i>	27
--	----

3.1.2.5.6.2. <i>Estabilidade nas mesmas condições de tempo e análise</i>	27
--	----

3.1.2.6. <i>Aplicação do método de LPME/LC-MS-MS no estudo de disposição cinética</i>	28
---	----

3.2. ANÁLISE ENANTIOSELETIVA DE MRT E SEUS METABÓLITOS EM URINA MÉTODO LPME/CE	28
--	----

3.2.1. Materiais	28
-------------------------------	----

3.2.1.1. <i>Reagentes e Solventes</i>	28
---	----

3.2.1.2. Soluções-padrão.....	29
3.2.1.3. Equipamento	29
3.2.1.3.1. Sistema eletroforético.....	29
3.2.1.3.2. Equipamentos empregados na preparação das amostras	30
3.2.1.4. Capilares.....	30
3.2.1.5. Seletores quirais.....	30
3.2.1.6. Amostras de urina	31
3.2.2. Métodos	31
3.2.2.1. Condicionamento de capilares novos.....	31
3.2.2.2. Condicionamento do capilar no início das análises e entre análises; substituição do tampão de análise e restauração do capilar.....	31
3.2.2.3. Armazenamento do capilar	32
3.2.2.4. Avaliação dos seletores quirais empregados em CE.....	32
3.2.2.5. Condições eletroforética para análise enantiosseletiva da mirtazapina de seus dois principais metabólitos	32
3.2.2.6. Ordem de eluição	32
3.2.2.7. Reação de hidrólise.....	33
3.2.2.8. Procedimento de preparação da amostra	33
3.2.2.9. Validação	34
3.2.2.10. Aplicação dos métodos no estudo de taxa de excreção urinária	34
3.3. ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DE MRT E SEUS METABÓLITOS EM URINA MÉTODO SPME.....	35
3.3.1. Materiais.....	35
3.3.1.1. Reagentes e Solventes.....	35
3.3.1.2. Equipamentos	35
3.3.2. Métodos	36
3.3.2.1. Otimização do procedimento de extração	36
3.3.2.2. Validação	37
3.3.2.3. Aplicação do método de SPME/LC-MS-MS no estudo de disposição cinética	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DE MRT E SEUS METABÓLITOS EM PLASMA MÉTODO LPME/LC-MS-MS	38
4.1.1. Avaliação das colunas quirais.....	38
4.1.1.1. Coluna Chiralpak AD.....	40
4.1.1.2. Coluna Chiralpak ADR-H	41
4.1.2. Determinação da ordem de eluição	42
4.1.3. Otimização dos parâmetros de extração Líquido-Líquido	44
4.1.3.1. Solvente orgânico.....	45
4.1.3.2. Ajuste do pH da matriz.....	46
4.1.4. Otimização dos parâmetros de microextração em fase líquida empregando fibras ocas	47
4.1.4.1. Fibra oca.....	47
4.1.4.2. Fase extratora	47
4.1.4.3. Fase aceptora.....	48
4.1.4.4. Tempo de extração	49
4.1.4.5. Agitação da amostra	50
4.1.4.6. Razão volumétrica das fases aceptora e doadora	50
4.1.4.7. Ajuste de pH.....	51
4.1.4.8. Modificadores orgânicos.....	51
4.1.4.9. Diluição do plasma	52
4.1.4.10. Adição de NaCl	52
4.1.4.11. Condições otimizadas de LPME em plasma humano.....	53
4.1.5. Validação.....	53
4.1.5.1. Linearidade	54
4.1.5.2. Limite de quantificação.....	55
4.1.5.3. Recuperação.....	56
4.1.5.4. Precisão e exatidão	57
4.1.5.5. Seletividade (supressão de ionização).....	58
4.1.5.6. Estudo de estabilidade	60
4.1.6. Aplicação do método no estudo de disposição cinética.....	61
4.2. ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DE MRT E SEUS METABÓLITOS EM URINA MÉTODO LPME/CE	62
4.2.1. Otimização da separação quiral eletroforética	62
4.2.1.1. Influência do tipo de ciclodextrina	63
4.2.1.2. Influência da concentração de ciclodextrina	63
4.2.1.3. Influência da composição do tampão de análise	64
4.2.1.4. Voltagem aplicada e efeito da temperatura de análise	65
4.2.2. Condições eletroforéticas otimizadas.....	66
4.2.3. Determinação da ordem de eluição	67

4.2.4. Reação de hidrólise.....	67
4.2.4.1. Procedimento otimizado de hidrólise enzimática.....	69
4.2.5. Otimização dos parâmetros de microextração em fase líquida	70
4.2.6. Validação.....	70
4.2.7. Aplicação dos métodos no estudo de disposição cinética.....	74
4.3. ANÁLISE ENANTIOSELETIVA DE MRT E SEUS METABÓLITOS EM URINA MÉTODO SPME.....	75
4.3.1. Otimização dos parâmetros de microextração em fase sólida	75
4.3.1.1. Tipo de recobrimento da fibra.....	76
4.3.1.2. Composição da amostra.....	76
4.3.2. Validação.....	80
4.3.3. Aplicação do método no estudo de taxa de excreção urinária	83
5. CONCLUSÕES	85
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
7. ANEXOS	93

1. INTRODUÇÃO

1.1. Técnicas de análise enantiosseletiva

Os enantiômeros de um fármaco quiral geralmente diferem em suas propriedades farmacológicas como consequência de interações estereosseletivas com macromoléculas biológicas opticamente ativas. Estas interações enantioespecíficas podem resultar em diferenças em um ou mais processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção do fármaco, bem como, em seus efeitos terapêuticos e/ou adversos. Tais diferenças resultaram na inclusão da estereoquímica como uma propriedade essencial a ser considerada no desenvolvimento de novos fármacos quirais. Aliado a isso, um completo entendimento da contribuição da estereoquímica na disposição cinética de fármacos quirais também é vital para determinar se um fármaco já desenvolvido ou usado como mistura racêmica deve ser substituído por um único isômero puro mais seguro e/ou efetivo (Caldwell, 1995).

Ao longo dos últimos anos, este quadro tem contribuído para um aumento significativo na demanda por métodos analíticos sensíveis e adequados para a exata e reprodutível determinação dos enantiômeros de fármacos e seus metabólitos em amostras biológicas. As técnicas cromatográficas têm sido tradicionalmente empregadas, com aplicações em estudos farmacocinéticos e de metabolismo *in vivo* e *in vitro*, bem como, em outros (Maier; Franco; Linder, 2001). Dentre essas técnicas, a cromatografia líquida de alta eficiência (*high-performance liquid chromatography*, HPLC), principalmente com o uso de fases estacionárias quirais, tem sido a mais freqüentemente utilizada (Yashima, 2001). As maiores desvantagens desse processo de separação quiral são o elevado custo das colunas quirais e o excessivo uso de solventes orgânicos como fase móvel, exceto quando são adotadas as microcolunas. Aliado a isso, muitas colunas quirais apresentam eficiência limitada, o que pode dificultar a resolução dos enantiômeros e de metabólitos estruturalmente similares ao fármaco de origem, ou de interferentes (Anová; Dutta, 2003). A solução total ou parcial desses problemas pode ser conseguida com o acoplamento da cromatografia líquida à espectrometria de massas (maior seletividade) ou o uso da eletroforese capilar (maior eficiência, menor custo e baixo ou nulo consumo de solvente orgânico).

1.1.1. Eletroforese Capilar

A eletroforese capilar (*capillary electrophoresis*, CE) é uma técnica analítica alternativa com numerosas vantagens, incluindo elevado poder de separação, uso praticamente nulo de solventes orgânicos, necessidade de baixa quantidade de amostra, curto tempo de análise, reduzido custo operacional e fácil automação (Issaq, 2002). O emprego da CE em separações quirais de fármacos e metabólitos em amostras biológicas ainda é uma prática não muito difundida, apesar da elevada eficiência nas separações permitir uma resolução em nível de linha de base dos enantiômeros do fármaco de interesse, mesmo com um baixo grau de enantiosseletividade. Essa elevada eficiência também é importante para prevenir a interferência dos componentes da matriz, metabólitos e outros fármacos co-administrados, contribuindo para a seletividade do método. A CE quiral é a técnica preferencial para a análise de fármacos polares e/ou básicos e seus metabólitos, principalmente metabólitos de fase II, que não são facilmente analisados por técnicas cromatográficas convencionais (Bonato, 2003).

Um esquema típico de um sistema de CE é mostrado na Figura 1. A fonte regulável de alta tensão é usada para estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar, com valores de voltagem de até 30 kV. A fonte de alta tensão é conectada, através de eletrodos (geralmente de platina), a dois reservatórios contendo uma solução de eletrólitos. Um dos eletrodos é conectado a um cabo condutor da fonte, ao passo que o outro é conectado a um fio terra, resultando na obtenção de um ânodo (+) e um cátodo (-), respectivamente (Altria, 1996). Primeiramente, o tubo capilar de sílica fundida é preenchido com uma solução de eletrólitos conveniente (geralmente uma solução tampão aquosa). A seguir, um pequeno volume da solução de amostra, da ordem de 1 a 20 nanolitros, é introduzido em uma das extremidades do capilar (usualmente o ânodo), pela substituição de um dos reservatórios da solução tampão por um outro que contém a amostra. A detecção dos compostos separados é feita na extremidade oposta do capilar. Após a introdução da amostra, as extremidades do capilar e os eletrodos são imersos nos reservatórios que contêm a solução tampão para completar o contato elétrico. Para minimizar os efeitos térmicos, o capilar deve ser mantido à temperatura constante (Altria, 1996).

Figura 1. Configuração instrumental de um sistema de CE (Kuhn, Hoffstetter-Kuhn, 1993).

A aplicação de um potencial elétrico através do capilar causa movimentos eletroforéticos e eletrosmóticos. O movimento eletroforético ou mobilidade eletroforética é inerente à espécie iônica. Portanto, cátions migram em direção ao cátodo (eletrodo negativo) e os ânions migram em direção ao ânodo (eletrodo positivo). Quanto maior a carga e menor o tamanho do íon, maior será a mobilidade. Por outro lado, o movimento eletrosmótico origina-se no ânodo, segue em direção ao cátodo e bombeia eficientemente os íons do soluto ao longo do capilar em direção ao detector. Esse movimento, denominado fluxo eletrosmótico (*Electroosmotic Flow*, EOF), ocorre em razão da ionização dos grupos silanóis ácidos (SiOH) presentes na parede interna do capilar de sílica, quando em contato com a solução tampão (Baker, 1995).

Além de permitir a análise simultânea de compostos neutros e carregados positivamente ou negativamente, o perfil do EOF é o responsável pela maior vantagem metodológica da CE em relação à HPLC, que é a sua eficiência.

A separação de enantiômeros por CE é feita, principalmente, pela adição de seletos quirais na solução de eletrólitos, resultando na formação de diastereoisômeros transitórios. A diferença de estabilidade das interações dos enantiômeros com o seletor quiral ocasiona diferentes mobilidades tempo-dependentes e proporciona a separação. Quando o seletor quiral adicionado à solução de eletrólito é neutro, a separação acontece no modo denominado de eletroforese capilar em solução livre (*capillary zone electrophoresis*, CZE) e esse modo é conveniente para a separação de solutos carregados no pH da solução tampão em que a análise está sendo feita. Solutos neutros podem ser resolvidos pelo uso de seletos quirais carregados ou seletos não carregados, desde que se tenha também no meio um tensoativo não quiral (modo cromatografia eletrocinética, *electrokinetic chromatography*, EKC). Esse

modo de separação também acontece quando se emprega tensoativos quirais (Tereba; Otsuka; Nishi, 1994). Dos vários seletores quirais utilizados, as ciclodextrinas (CD) e seus derivados, são reconhecidamente os mais importantes.

A maior desvantagem da CE é o limite de detecção relativamente alto, como consequência do limitado volume da amostra analisada e da restrição do caminho óptico viável para detecção, quando se emprega detecção por absorção no UV-Vis. Para minimizar essas limitações instrumentais, várias medidas têm sido tomadas, como por exemplo, o uso de sistemas de detecção mais sensíveis (Hempel, 2000) e de procedimentos de extração das matrizes que concentram os solutos de interesse (Sentellas; Puignou; Galceran, 2002).

1.1.2. *Cromatografia líquida-espectrometria de massas (LC-MS-MS)*

A hifenização de instrumentos analíticos é motivada pela crescente necessidade de identificar e quantificar substâncias químicas em matrizes complexas. Os esforços nessa hifenização têm sido recompensados, principalmente, com o acoplamento de técnicas cromatográficas ou eletroforéticas à espectrometria de massas. Nesse caso, combinam-se as vantagens das técnicas de separação, i.e., alta eficiência e seletividade na separação, e da espectrometria de massas, i.e., informação estrutural e incremento adicional na seletividade. A detectabilidade, outra vantagem da espectrometria de massas, permite a obtenção de espectros de massas e quantificação de compostos presentes em nível de traços nessas matrizes complexas (Al-Dirbashi; Nakashima, 2000).

O sucesso no acoplamento da espectrometria de massas com a cromatografia líquida de alta eficiência só foi alcançado com o desenvolvimento de interfaces para ionização à pressão atmosférica, o que possibilita o uso de fases móveis e vazões compatíveis com as análises de rotina (Niessen, 1999). Essas interfaces promovem a ionização branda dos compostos, resultando em espectros de massas constituídos principalmente do íon molecular, o que limita a obtenção de informações estruturais. A introdução de equipamentos triplo quadrupolo (Figura 2) ou *ion trap*, que possibilitam a obtenção de etapas múltiplas de fragmentação e fornecem importantes informações estruturais, expandiu a gama de aplicações da técnica. O uso de LC-MS-MS apresenta ainda uma vantagem adicional, a seletividade, fator importante a ser considerado quando essa técnica é empregada com propósitos de quantificação de compostos presentes em nível de traços em matrizes complexas (Niessen, 1999).

Figura 2. Diagrama representativo de um sistema de LC-MS-MS.

O emprego de colunas quirais no sistema LC-MS-MS requer cuidados especiais com a seleção das fases móveis empregadas, uma vez que, fases móveis altamente aquosas ou baseadas em soluções tampão não voláteis levam a supressão da ionização durante a detecção por MS e/ou problemas operacionais e, fases móveis baseadas em hexano podem apresentar riscos, principalmente no modo ionização química a pressão atmosférica. Para solucionar esses problemas, pode-se utilizar a mistura pós-coluna com fases móveis mais adequadas (tampão acetato de amônia:iso-propanol, por exemplo), antes do efluente da coluna entrar na interface do MS, o que também melhora a ionização do composto (Bakhtiar; Ramos; Tse, 2001).

1.2. Preparação das amostras

A análise de fármacos em plasma ou urina normalmente é complicada pelas baixas concentrações do composto ($0,1-10 \text{ ng mL}^{-1}$), pela complexidade das matrizes biológicas e, no caso de plasma, pelo limitado volume das amostras disponíveis para a determinação (normalmente $0,5-1 \text{ mL}$) (Rasmussen; Pedersen-Bjergaard, 2004). Conseqüentemente, é imprescindível a disponibilidade de procedimentos eficazes de preparação da amostra antes da análise. A extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*, LLE) e a extração em fase sólida (*solid-phase extraction*, SPE) são as duas técnicas de preparação de amostras mais freqüentemente empregadas na análise de fármacos quirais em matrizes biológicas. Entretanto, essas técnicas tradicionais são consideradas tediosas, demoradas e apresentam múltiplos estágios de operação. Aliando a isso, o volume de solvente orgânico necessário nas duas técnicas é um aspecto preocupante, devido ao custo e problemas de poluição ambiental (Queiroz; Collins; Jardim, 2001). Esses inconvenientes podem ser evitados através do

emprego de microtécnicas de extração relativamente rápidas e simples, e que não utilizam ou utilizam microvolumes de solventes orgânicos durante a etapa de preparação das amostras.

1.2.1. Microextração em fase sólida

A microextração em fase sólida (*solid-phase microextraction*, SPME) (Figura 3A) é uma técnica relativamente nova de extração e pré-concentração dos compostos, introduzida por Arthur e Pawliszyn em 1990 (Arthur; Pawliszyn, 1990) e que emprega uma fibra ótica de sílica fundida (100 μm de diâmetro) recoberta com um filme fino de um polímero (por exemplo, polidimetilsiloxano (PMDS), poliacrilato (PA) ou Carbowax (CWX)) ou de um adsorvente sólido (por exemplo, carvão ativado microparticulado, Carboxen) com espessura de recobrimento variando entre 7 e 100 μm e volumes entre 0,03 μL e 0,7 μL (Valente; Augusto, 2000). Neste processo, os compostos são distribuídos entre o polímero extrator e a matriz em função de suas propriedades físico-químicas até que seja atingido o estado de equilíbrio. Esta fibra ótica, junto com a fase extratora, é acondicionada dentro da agulha de uma microseringa. Para a extração dos compostos, a fibra é colocada em contato direto com a amostra (extração direta) ou na fase vapor de um recipiente fechado (extração indireta, *headspace*); após extração sob agitação constante, os compostos presentes na fibra são desorvidos e introduzidos na instrumentação analítica requerida (HPLC ou GC) (Lord; Pawliszyn, 2000). A SPME é uma técnica mais simples e rápida que a LLE e a SPE; em geral são obtidos extratos mais limpos e não se emprega solvente orgânico para a dessorção (GC). No entanto, a natureza relativamente frágil das fibras empregadas em SPME limita sua utilização. Aliado a isso, o uso da mesma fibra em diversas extrações pode levar a contaminações entre extrações consecutivas (Queiroz; Collins; Jardim, 2001).

Figura 3. Descrição esquemática dos sistemas de microextração SPME (A) e LPME (B)

1.2.2. Microextração em fase líquida

Pedersen Bjergaard e Rasmussen recentemente introduziram um conceito alternativo de extração em membranas, denominado microextração em fase líquida (*liquid-phase microextraction*, LPME), que combina os princípios da LLE com a natureza miniaturizada da SPME para obter as vantagens das duas técnicas; baseia-se no uso de uma fibra cilíndrica simples, de baixo custo, comercialmente disponível e microporosa, feita de polipropileno (Pedersen-Bjergaard; Rasmussen, 1999). Nesta técnica, a amostra aquosa de interesse normalmente é transferida para um pequeno recipiente com capacidade para 1 a 4 mL e uma fibra oca de 1,5 a 10 cm é mergulhada nesse recipiente (Figura 3B). Antes da extração, a fibra é imersa no solvente orgânico para imobilizá-lo nos seus poros e o excesso é removido por imersão em água. A seguir, o lúmen da fibra oca é preenchido com microlitros (15 a 25) da solução aceptora que pode ser o próprio solvente usado na etapa anterior (sistema de duas fases) ou uma solução aquosa de pH contrário ao da solução doadora (sistema de três fases) (Rasmussen; Pedersen-Bjergaard, 2004).

No sistema de duas fases, o composto *i* é extraído da solução aquosa (fase doadora, *d*), através de um solvente imiscível em água imobilizado nos poros da fibra, para o mesmo solvente orgânico (fase aceptora, *org*) presente no interior dessa fibra. O processo de extração 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 composto *i* nas fases orgânica e doadora em condições de equilíbrio. Para obter sucesso na LPME em duas fases, é necessário que o composto 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 GC ou HPLC de fase normal (Rasmussen et al., 2000).

Na LPME em três fases, o composto *i* é extraído da solução aquosa (fase doadora, *d*) através de um solvente orgânico imiscível em água imobilizado nos poros da fibra (fase orgânica, *org*) até outra fase aquosa (fase aceptora, *a*), presente no interior do lúmen da fibra. 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 composto *i* no modo três fases pode ser ilustrado como segue:

O processo 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 compostos na fase aceptora são convertidos por reações, tais como protonação ou complexação, em espécies que terão uma afinidade muito menor pelo solvente orgânico. Dessa forma, previnem-se extrações do composto 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, de baixo custo, é praticamente 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 da extração através da modificação do solvente de extração, de modo semelhante ao que acontece em LLE. Esse método apresenta ainda elevados valores de 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).

A cinética dos processos de microextração depende de numerosos parâmetros (agitação, tipo de solvente extrator, tempo de extração, ajuste de pH, de temperatura, da razão das fases, adição de modificador orgânico e força iônica) e sua eficiente otimização garante máxima extração do composto (Lord; Pawliszyn, 2000; Psillakis; Kalogerakis, 2003).

1.3. Propriedades estereosseletivas da mirtazapina

A mirtazapina (MRT) (1,2,3,4,10,14b-hexahidro-2-metil-pirazino [2,1-a] pirido [3,2-c] benzapina) é um novo antidepressivo (Timmer; Sitsen; Delbressine, 2000; Delbressine *et al.*, 1998), com dupla ação tanto no sistema neurotransmissor serotoninérgico quanto no noradrenérgico, comercializada no Brasil sob a denominação Remeron[®] (Analytical Control Labs., N.V. Organon, Oss, Holanda).

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

A MRT é empregada na clínica como um racemato (Figura 4), embora os enantiômeros (+)-(S)-MRT e (-)-(R)-MRT apresentem efeitos terapêuticos enantiosseletivos. As propriedades bloqueadoras do α_2 -heteroreceptor estão relacionadas tanto com o (+)-(S)-quanto o (-)-(R)-MRT; 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 5HT₃ reside predominantemente no (-)-(R)-MRT (Fawcett; Barkin, 1998). Nesse contexto, a quantificação separada dos enantiômeros em fluidos biológicos pode ser importante na determinação da resposta clínica.

Figura 4. Estrutura dos enantiômeros da MRT (Dodd; Burrows; Norman, 2000).

A MRT é parcialmente metabolizada a 8-hidroximirtazapina (8-OHM) (aproximadamente 40%). O esquema de biotransformação é mostrado na Figura 5. Essa reação é catalisada principalmente pelo CYP2D6 e em menor extensão pelo CYP1A2. A MRT sofre também N-desmetilação (aproximadamente 25%) e N-oxidação (aproximadamente 10%), catalisadas pelo CYP3A4, resultando na formação de desmetilmirtazapina (DMR) e N-óxido-mirtazapina, respectivamente. Esses metabólitos formados são conjugados com o ácido glicurônico ou, em menor extensão, com sulfato. A MRT também sofre conjugação direta com o ácido glicurônico formando uma amônia quaternária N⁺-Glicuronida (aproximadamente 25%) (Delbressine *et al.*, 1998).

Figura 5. Esquema da biotransformação da MRT: 1 = 8-hidroxilação seguida de conjugação; 2 = N⁺-Glicuronidação; 3 = N-Oxidação; 4 = Desmetilação seguida de conjugação (Delbressine *et al.*, 1998).

A DMR, principal metabólito da MRT, é formada no fígado e contribui entre 3-6% do total do perfil farmacodinâmico do fármaco (Delbressine *et al.*, 1998).

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

Por outro lado, estudos com os enantiômeros isolados revelaram efeitos diferentes do polimorfismo genético do CYP2D6. Para o enantiômero (-)-(R)-MRT, não há diferenças entre os metabolizadores rápidos (*extensive metabolizer*, EM) e os metabolizadores lentos (*poor metabolizer*, PM) para nenhum dos parâmetros cinéticos. Entretanto, para a (+)-(S)-MRT, a área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo é maior em PM, e observa-se um correspondente prolongamento da meia-vida de eliminação. Considerando que os PMs não

apresentam ou apresentam apenas baixa atividade do CYP2D6, e por isso podem hidroxilar a MRT em uma menor extensão, espera-se concentrações maiores da MRT na forma N⁺-glicuronídeo (Timmer; Sitsen; Delbressine, 2000).

Além do fenótipo oxidativo, a enantiosseletividade na farmacocinética da MRT administrada por via oral em indivíduos ditos metabolizadores rápidos tem extrema relevância na grande variabilidade interindividual exibida na disposição cinética deste fármaco demonstrada em algumas publicações (Timmer; Sitsen; Delbressine, 2000). Aliado a isso, Paus *et al.* (2004) mostraram recentemente a influência de alguns fármacos inibidores do CYP2D6 na razão (-)-(R)/(+)-(S) em pacientes tratados concomitantemente com outros fármacos. Assim sendo, a identificação do tipo de metabolizador e dos fatores responsáveis por concentrações plasmáticas com razões enantioméricas ((-)-(R)/(+)-(S)) diferentes da unidade, são fundamentais na definição das origens de variabilidade individual na resposta aos fármacos empregados na terapêutica.

1.3.1. Análise enantiosseletiva

O primeiro método analítico de determinação da MRT em fluidos biológicos que se tem notícia data de 1987 e foi escrito por Paanakker *et al.* (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 onde a determinação da MRT, 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; Romiguieres *et al.*, 2002; Morgan; Spencer; Tapper, 2003; Ptacek; Klima; Macek, 2003; Shams; Hiemke; Härtter, 2004). Entretanto, nenhum trabalho tratava da determinação das formas individuais dos enantiômeros da MRT até o ano de 2000, quando Dodd; Burrows; Norman (2000) propuseram um método de análise enantiosseletiva para determinação de MRT em plasma humano utilizando para isso uma coluna quiral derivada de amilose (Chiralpak AD) e fase móvel constituída por hexano: iso-propanol:etanol (98:1:1), com detecção em 290 nm. A MRT foi isolada do plasma humano por SPE e o método foi validado no intervalo de concentração plasmática de 10 a 100 ng mL⁻¹ para cada enantiômero. Aliado a isso, o método foi usado para determinar os níveis dos enantiômeros da MRT em plasma de pacientes que estavam sendo tratados para depressão com Remeron[®].

A LLE e a coluna Chiralpak AD foram posteriormente empregadas pelo nosso grupo (de Santana, Cesarino, Bonato, 2004) para a análise enantiosseletiva da MRT em plasma humano, tendo sido obtidos parâmetros de validação superiores ao método anteriormente descrito, com limite de quantificação (LQ) de 5 ng mL⁻¹.

Ainda em 2004, Mandrioli *et al.* descreveram um método de análise enantiosseletiva da MRT e seu principal metabólito ativo, DMR, em plasma humano utilizando CE como instrumento analítico, carboximetil-β-CD como seletor quiral e SPE como técnica de pré-tratamento e pré-concentração, com LQ de 5 ng mL⁻¹.

Também em 2004, Paus *et al.* propuseram a análise enantiosseletiva da MRT e seus metabólitos em plasma de pacientes tratados com este antidepressivo. Neste caso, as amostras foram preparadas por LLE, separadas por HPLC em uma coluna Chirobiotic V e detectadas por MS no modo *electrospray*. O método apresentou LQ de 0,5 ng mL⁻¹.

No segundo semestre de 2005, nosso grupo publicou, pela primeira vez, um trabalho no qual a LPME foi empregada no pré-tratamento de amostras de plasma humano fortificadas com a MRT (de Santana, de Oliveira, Bonato). A resolução dos enantiômeros foi obtida em uma coluna Chiralpak AD sob as mesmas condições cromatográficas anteriormente desenvolvidas em nosso laboratório. Esse método apresentou um valor de LQ próximo aquele obtido anteriormente no estudo que empregava a LLE com técnica de preparação de amostras (de Santana, Cesarino, Bonato, 2004) e foi igual a 6,25 ng mL⁻¹ de cada enantiômero.

No mesmo período, Fanali *et al.* obtiveram a separaram dos enantiômeros da MRT e de dois dos seus principais metabólitos (8-OHM e DMR) por nano-cromatografia líquida em colunas capilares (75 μm de diâmetro interno) de sílica fundida modificada com vancomicina; a detecção do fármaco e metabólitos foi feita por absorção no UV-Vis em 205 nm e espectrometria de massas no modo *eleetroctrospray*. As amostras de plasma humano foram submetidas a SPE e o método validado apresentou LQ entre 5 e 15 ng mL⁻¹.

Um método analítico e semipreparativo utilizando fases estacionárias quirais derivadas de celulose e amilose e fases móveis no modo normal e polar orgânico foi desenvolvido por Zhai, Shi, Wang (2005) para a resolução da MRT. Neste estudo, foram obtidas as duas formas enantioméricas isoladas com uma pureza adequada.

Mais recentemente, em 2006, Meineke *et al.* propuseram um estudo enantiosseletivo de monitoramento terapêutico da MRT e de três dos seus metabólitos 8-OHM, DMR e N-óxidomirtazapina empregando uma coluna derivada de antibiótico (Chirobiotic V) e detecção por fluorescência. O método apresentou baixa resolução cromatográfica dos enantiômeros e

prolongado tempo de análise. As amostras de plasma e soro foram tratadas por SPE e analisadas na concentração plasmática de 1 a 100 ng mL⁻¹ para cada enantiômero.

Os dados apresentados mostram que, nos últimos anos, houve um grande interesse no desenvolvimento de métodos para análise enantiosseletiva da MRT e de seus metabólitos, mas, exceto pelo método publicado por nosso grupo, todos os demais fazem uso de técnicas tradicionais de preparação de amostras (SPE e LLE). Sendo assim, estamos propondo o desenvolvimento de métodos para a determinação enantiosseletiva da MRT e de dois dos seus principais metabólitos em plasma e urina (DMR e 8-OHM) de voluntários sadios tratados com este antidepressivo, empregando a CE e a LC-MS-MS como técnicas de análise, bem como, a SPME e a LPME como técnicas alternativas de preparação das amostras.

2. OBJETIVOS

O presente estudo tem por finalidade avaliar técnicas de microextração, CE e LC-MS-MS para a análise enantiosseletiva da MRT e de seus metabólitos 8-OHM e DMR em fluidos biológicos.

Para atingir esses objetivos, as seguintes etapas foram concluídas:

- Validação do método enantiosseletivo para determinação dos enantiômeros da MRT, 8-OHM e DMR em plasma, empregando LPME na preparação das amostras e análise por LC-MS-MS.
- Validação do método enantiosseletivo para determinação dos enantiômeros da MRT, 8-OHM e DMR em urina, empregando LPME na preparação das amostras e análise por CE.
- Validação do método enantiosseletivo para determinação dos enantiômeros da MRT, 8-OHM e DMR em urina, empregando SPME na preparação das amostras e análise por CE (etapa de otimização da técnica de extração) e LC-MS-MS (etapa de validação e aplicação do método).
- Aplicação dos métodos desenvolvidos e validados em um estudo piloto de disposição cinética enantiosseletiva com voluntário sadio.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Análise enantiosseletiva de MRT e seus metabólitos em plasma

Método LPME/LC-MS-MS

3.1.1. Materiais

3.1.1.1. Reagentes e solventes

Os solventes orgânicos usados na preparação da fase móvel (metanol, etanol e acetonitrila), e na etapa de seleção do solvente orgânico extrator em LLE e LPME (clorofórmio, acetato de etila, éter diisopropílico e tolueno) foram todos grau cromatografia e obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) ou Mallinckrodt (St Louis, Missouri, EUA). Os solventes iso-octanol, n-octanol, acetato de dodecila e acetato de hexila, obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), bem como, o éter n-hexílico obtido da Alfa Aesar (Ward Hill, Massachusetts, EUA), o álcool isoamílico, obtido da J.T.Baker (Phillipsburg, New Jersey, EUA), e o acetato de butila, obtido da Nuclear (São Paulo, São Paulo, Brasil), completam a lista de solventes orgânicos utilizados na etapa de otimização da fase orgânica extratora em LLE e LPME.

A dietilamina (DEA), obtida da Fluka (Buchs, Suíça), o ácido trifluoroacético (TFA) e o ácido clorídrico, ambos obtidos da Mallinckrodt (St Louis, Missouri, EUA), o ácido perclórico e o NaOH, obtidos da Nuclear (São Paulo, São Paulo, Brasil) e o ácido acético glacial, obtido da Cinética Reagentes & Soluções (Jandira, São Paulo, Brasil) foram todos grau p.a. Os demais reagentes empregados na preparação das soluções tampão fosfato de sódio e o sal cloreto de sódio, utilizado na otimização da LPME, também foram grau p.a. e obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

3.1.1.2. Soluções-padrão

A *rac*-MRT (código do laboratório Org 3770) e seus metabólitos racêmicos DMR (código do laboratório Org 30628) e 8-OHM (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 MRT, DMR e 8-OHM utilizadas para o trabalho cotidiano foram preparadas em metanol, nas concentrações de 0,1 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a partir da diluição de uma solução-padrão estoque preparada na concentração de 1 mg mL^{-1} . Uma solução-padrão de haloperidol (HAL) (Figura 6A) foi preparada em metanol na

concentração de $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e empregada como padrão interno. O HAL foi gentilmente cedido pela Janssen-Cilag Ltda (São José dos Campos, São Paulo, Brasil). Por sua vez, uma solução-padrão de mianserina racêmica (*rac*-MIA) (Figura 6B) foi preparada em metanol na concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ e empregada como padrão interno nas análises envolvendo a LLE. O MIA foi gentilmente cedido pela Analytical Control Labs., N.V. Organon (Oss, Holanda). Todas as soluções foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e protegidas da ação da luz; sob essas condições, elas permaneceram estáveis por pelo menos 3 meses.

Figura 6. Estrutura dos fármacos empregados como padrões internos (A) HAL e (B) *rac*-MIA.

As soluções dos outros fármacos avaliados como padrão interno foram preparadas em metanol, na concentração de 1 mg mL^{-1} .

3.1.1.3. Amostras de plasma humano

As amostras de plasma humano, livres da MRT, DMR, 8-OHM, HAL e MIA, denominadas amostras de plasma branco, foram fornecidas pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo e foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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.

3.1.1.4. Equipamentos

3.1.1.4.1. Sistema cromatográfico

As análises cromatográficas foram conduzidas empregando um equipamento da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), composto de duas bombas modelo LC-10AD de duplo pistão e um sistema controlador modelo SCL-10. As injeções foram realizadas manualmente com injetor Rheodyne modelo 7125 (Rheodyne, Cotati, EUA) e amostrador de $20 \mu\text{L}$. A detecção foi

realizada empregando um espectrômetro de massas Quattro LC, triplo quadrupolo (Micromass, Manchester, UK), calibrado com sódio/iodeto de cério no intervalo de 50 a 2000 Da e equipado com uma interface *electrospray* (ESI), operando no modo positivo (Figura 7). A quantificação foi conduzida por MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) das moléculas protonadas ($[M+H]^+$) e seus respectivos fragmentos, usando um método de calibração que emprega a padronização interna e ponderação de $1/x^2$. As condições do espectrômetro de massas (principalmente energia de colisão e voltagem do cone, Tabela 1) foram otimizadas pela infusão direta de soluções de *rac*-MRT, *rac*-DMR, *rac*-8-OHM e dos padrões internos, preparadas em metanol, na vazão de $20 \mu\text{L min}^{-1}$. As temperaturas da fonte de ionização e de dessolvatação foram de 100 e 250°C , respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás de secagem e de nebulização, e o argônio foi utilizado como gás de colisão.

Figura 7. Esquema de um sistema MS-MS no modo MRM.

Tabela 1. Razão m/z dos compostos protonados $[M+H]^+$; fragmento monitorado na transição, energia de colisão, voltagem do cone e tempo de retenção dos enantiômeros da 8-OHM, MRT, DMR, MIA e HAL.

Fármacos/Metabólitos	$[M+H]^+$	Fragmento	Voltagens do cone	EC ^a (eV) ^c	Tempo de retenção (min)
			(V) ^b		
8-OHM	282	211	35	30	2,8/3,5
MRT	266	195	30	25	3,5/4,7
DMR	252	195	30	30	4,3/7,3
MIA	265	208	25	20	2,3/3,3
HAL	376	123	30	35	4,8

^aEC, voltagens da célula de colisão;

^bV, Volts;

^ceV, eletron volts .

Na saída da coluna, o efluente do sistema LC foi dividido por uma válvula e apenas um fluxo de aproximadamente $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ foi introduzido no capilar de aço inoxidável do espectrômetro de massas. O equipamento foi controlado pelo programa MassLynx NT V3.4, que também foi utilizado para aquisição e tratamento dos dados.

Espectros de dicroísmo circular (circular dichroism, CD) da MRT, DMR e 8-OHM e dos isômeros opticamente puros (-)-(R)- e (+)-(S)- dissolvidos em metanol foram obtidos a 25 °C em um espectropolarímetro da marca Jasco, modelo J-810, equipado com um dispositivo de controle interno de temperatura (Jasco, modelo PTC-423S), usando uma cubeta de quartzo com 1cm de caminho óptico. Cromatogramas também foram obtidos usando um detector CD da marca Jasco, modelo CD-1595 (Jasco, Tóquio, Japão) com cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

3.1.1.4.2. Equipamentos empregados na preparação das soluções tampão

As soluções tampão empregadas no pré-tratamento das amostras foram preparadas pela dissolução de sais em água de acordo com a equação de Henderseen-Halselbach:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{sal}]}{[\text{ácido}]}$$

e, seus valores de pH foram confirmados empregando um peagômetro da marca Corning, modelo 430 (Nova Iorque, New York, EUA). Todas as soluções foram armazenadas a 4 °C por um período de até 5 dias. A água utilizada na preparação das soluções tampão foi purificada para a eliminação de resíduos orgânicos e inorgânicos empregando o sistema MILLI-Q-PLUS® Millipore/Millipore Corporation (Bedford, Massachusetts, EUA).

3.1.1.4.3. Equipamentos empregados na preparação das amostras

Na etapa de preparação das amostras de plasma empregando a LLE foram utilizados (i) um agitador de tubos da marca Phoenix, modelo AP56 (Araraquara, São Paulo, Brasil), (ii) um agitador horizontal da marca Pachane, modelo PA241 (Piracicaba, São Paulo, Brasil) e (iii) uma centrífuga Excelsa Baby II®, modelo 206-R da marca Fanen (São Paulo, São Paulo, Brasil). Quando a LPME foi empregada no pré-tratamento das amostras de plasma, utilizou-se os seguintes equipamentos: (i) um agitador de tubos da marca Phoenix, modelo AP56 (Araraquara, São Paulo, Brasil), (ii) um agitador magnético da marca Marconi, modelo TE 085 (Piracicaba, São Paulo, Brasil) e um ultrasson da marca Thorton Unique, modelo USC1450 (Santo André, São Paulo, Brasil). Durante o procedimento de LPME, além dos equipamentos acima citados foram empregadas fibras cilíndricas ocas e microporosas de polipropileno, denominadas de fibras ocas, modelo Q 3/2 Acurrel® PP (Membrana GmbH, Wuppertal, Alemanha) e uma microseringa com capacidade para 50 µL, da marca Hamilton company, modelo 702SNR, 50 µL (Hamilton company, Reno, Nevada, EUA).

3.1.1.5. Colunas com fases estacionárias quirais e coluna de guarda

Baseando-se nos resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório para a resolução quiral da MRT, DMR e 8-OHM (de Santana, Cesarino, Bonato, 2004), no presente estudo foram avaliadas unicamente duas colunas baseadas em derivados de amilose (Figura 8) frente a diversas condições cromatográficas de análise no modo polar orgânico, com o objetivo de definir a fase estacionária quiral e fase móvel mais apropriada para a separação enantiomérica do fármaco e seus dois principais metabólitos, visando obter picos simétricos e tempos de análise considerados relativamente curtos. Na seleção da coluna cromatográfica foi considerada também a compatibilidade entre as fases móveis e o detector de espectrometria de massas. Assim sendo, foram avaliadas as seguintes colunas quirais:

- Coluna Chiralpak AD (250 mm x 4,6 mm [L x D.I.], Chiral Technologies, Exton, Filadelfia, EUA) constituída do derivado de amilose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 10 µm.
- Coluna Chiralpak AD-RH (150 mm x 4,6 mm [L x D.I.], Chiral Technologies, Exton, Filadelfia, EUA) constituída do derivado de amilose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 5 µm.

Figura 8. Estrutura geral de uma fase estacionária Chiralpak AD ou Chiralpak ADR-H no qual se observa um suporte de sílica recoberto com o derivado do polissacarídeo amilose.

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

3.1.2. Métodos

3.1.2.1. Avaliação das colunas cromatográficas quirais empregadas em LC-MS-MS

A resolução dos enantiômeros da MRT e dos seus metabólitos DMR e 8-OHM foi avaliada a $23 (\pm 2) ^\circ\text{C}$. Alíquotas de $25 \mu\text{L}$ de soluções-padrão de *rac*-MRT, *rac*-DMR e *rac*-8-OHM 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 $50 \mu\text{L}$ de fase móvel e $20 \mu\text{L}$ foram cromatografados. As colunas Chiralpak AD e Chiralpak AD-RH foram empregadas em condições de fase polar orgânica, com fases móveis constituídas por misturas de metanol, etanol e acetonitrila, em diferentes proporções. A adição de uma base orgânica (DEA) e/ou um ácido orgânico (TFA) também foi considerada e otimizada visando reduzir a interação dos analitos básicos com os grupos silanóis residuais da coluna cromatográfica, amenizando, dessa forma, as caudas nos picos, o que dificultaria a resolução.

A separação foi avaliada empregando os parâmetros resolução (R_s), fator de retenção (k), fator de separação (α) e eficiência da coluna (número de pratos, N).

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, 1997a).

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) foram avaliados somente para o sistema que apresentou 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 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.

3.1.2.2. Condições cromatográficas para análise enantiosseletiva da mirtazapina e de seus dois principais metabólitos

A melhor resolução dos enantiômeros da MRT, DMR, OHM e do HAL foi alcançada na coluna Chiralpak ADR-H empregando a fase móvel constituída por metanol: etanol: acetonitrila (90:5:5, v/v/v) mais 0,2% de DEA. A vazão foi mantida em 1 mL min⁻¹ e a detecção foi feita em um MS-MS operando no modo MRM com ionização no modo *eletrospray* positivo.

3.1.2.3. Ordem de eluição

A ordem de eluição dos enantiômeros da MRT, 8-OHM, DMR foi definida a 23 (±2) °C, submetendo as misturas racêmicas e os enantiômeros opticamente puros (-)-(R)- e (+)-(S)- à detecção por CD. Os cromatogramas das formas racêmicas foram obtidos empregando um equipamento de LC com detector de CD operando em 253 nm e sob as mesmas condições cromatográficas acima estabelecidas para o método de LC-MS-MS (seção 3.1.2.2.). Por sua vez, espectros de dicroísmo circular (205 a 350 nm) das soluções dos enantiômeros opticamente puros (isolados por HPLC semipreparativa) preparadas em metanol foram obtidos no modo contínuo com uma razão de 100 nm min⁻¹, sensibilidade de 10 mdeg e resposta de 0,25 s.

3.1.2.4. Procedimento de preparação da amostra

Uma vez estabelecidas as condições ótimas de separação dos enantiômeros, a etapa seguinte foi a otimização do procedimento de preparação das amostras, a fim de estabelecer as melhores condições para extrair ao máximo os compostos de interesse, com máxima recuperação e mínima extração possível dos agentes endógenos e interferentes do plasma.

Tais condições foram avaliadas primeiramente empregando a técnica de LLE e, em seguida, a LPME. O procedimento genérico de LLE está descrito na Figura 9 e as condições otimizadas da LPME estão presentes nas seções 4.1.4.11.

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

3.1.2.4.1. Extração líquido-líquido

Para otimização desse procedimento, as análises foram realizadas com 1 mL de amostras de plasma branco, previamente centrifugado durante 10 minutos a 2000 x g, e fortificado com 25 µL das soluções-padrão de *rac*-MRT, *rac*-DMR e *rac*-8-OHM na concentração de 500 ng mL⁻¹ e padrão interno. Amostras de (i) plasma branco (ii) plasma branco fortificado após a extração com soluções-padrão de *rac*-MRT, *rac*-DMR, *rac*-8-OHM e padrão interno e (iii) alíquotas de 1 mL de água purificada no sistema MILLI-Q-PLUS®, também foram processadas nas condições acima, para verificar a presença de interferentes endógenos no plasma humano, a possibilidade de supressão na ionização dos compostos 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. Dessa forma, a influência do pH da fase aquosa na extração foi avaliada com o uso de uma solução de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e de soluções tampão fosfato de sódio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8 e 11.

Na avaliação do solvente orgânico extrator utilizado na LLE, foram empregados volumes de 4 mL de tolueno, clorofórmio, acetato de etila, diclorometano, éter diisopropílico, álcool isoamílico, bem como misturas desses solventes em diferentes proporções, e foram recuperados apenas 3 mL após o término da extração. Todas as extrações foram realizadas a $23 (\pm 2) ^\circ\text{C}$.

3.1.2.4.2. Microextração em fase líquida empregando fibras ocas

Na otimização da LPME foram realizadas análises utilizando amostras de 1 mL de plasma branco, previamente centrifugadas durante 10 minutos a $2000 \times g$, e fortificadas com 25 μL de soluções-padrão de *rac*-MRT, *rac*-DMR e *rac*-8-OHM na concentração plasmática de 31,25 ng de cada enantiômero mL^{-1} e padrão interno. Essas amostras foram diluídas com tampão fosfato de sódio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8 para um volume final de 4 mL. Amostras de (i) plasma branco; (ii) plasma branco fortificado após a extração com soluções-padrão de *rac*-MRT, *rac*-DMR *rac*-8-OHM e padrão interno e (iii) alíquotas de 4 mL de água purificada no sistema MILLI-Q-PLUS[®], foram processadas nas mesmas condições acima, para verificar a presença de interferentes endógenos no plasma humano, a possibilidade de supressão na ionização dos compostos e a pureza dos reagentes, respectivamente. Todas as extrações foram realizadas a $35 (\pm 2) ^\circ\text{C}$.

Na etapa de otimização do procedimento de extração empregando LPME foram avaliados os parâmetros (i) tamanho da fibra oca, (ii) tipo de solvente orgânico, (iii) adição de NaCl, (iv) tempo de extração, (v) ajuste de pH, (vi) diluição do plasma, (vii) modificadores orgânicos, (viii) agitação da amostra, (ix) fase aceptora .

Para cada extração, uma nova fibra com diâmetro interno de 600 μm , espessura das paredes de 200 μm , poros de 0,2 μm e apresentando uma das extremidades obstruída foi fixada pela outra extremidade em uma microseringa e, em seguida, a fibra foi imersa no solvente orgânico durante 20 segundos para imobilizá-lo nos poros. O excesso de solvente foi removido pela imersão, sob agitação, em água purificada no sistema MILLI-Q-PLUS[®]. A fase aceptora foi introduzida na fibra e o sistema foi então mergulhado na matriz plasmática.

Durante toda a extração, a unidade foi sonicada constantemente. Após extração, a fase aceptora foi removida da fibra por retração do êmbolo da microseringa e transferida para um tubo de fundo cônico. Por último, a fase aceptora foi evaporada sob fluxo de ar comprimido, o resíduo foi dissolvido em 40 μL da fase móvel e 20 μL foram analisados em LC-MS-MS, sob as condições cromatográficas apresentadas na seção. 3.1.2.2. Um esquema ilustrativo dos princípios básicos de LPME está presente na Figura 10.

Figura 10. Esquema ilustrativo dos princípios básicos da LPME (A) corresponde a amostra de interesse e (M) corresponde a matriz biológica.

3.1.2.5. Validação

Com exceção do método que utilizou a LLE na preparação das amostras de plasma, os demais métodos desenvolvidos nesse trabalho foram validados e seguiram as recomendações da literatura (Peng; Chiou, 1990; Quattrocchi; Andrizzi; Laba, 1992; Shah *et al.*, 1992; Bressole; Bromet-Petit; Audran, 1996; Snyder; Kirkland; Glajch, 1997b; 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.

3.1.2.5.1. Curvas analíticas e Linearidade

Amostras de plasma branco (1 mL) previamente centrifugadas e fortificadas com *rac*-MRT, *rac*-DMR e *rac*-8-OHM nas concentrações plasmáticas de 1,25; 3,75; 6,25; 18,75; 31,25; 62,5 e 125 ng de cada enantiômero mL^{-1} e 25 μL da solução-padrão de HAL na concentração plasmática de 31,25 ng mL^{-1} ($n = 2$ para cada concentração) foram utilizadas na construção das curvas analíticas.

As curvas analíticas foram construídas relacionando a razão das áreas dos picos (eixo das ordenadas) *versus* suas respectivas concentrações (eixo das abcissas). 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).

3.1.2.5.2. Limite de quantificação

O LQ do método foi determinado usando 1 mL de amostras de plasma fortificadas (n=5) com 1,25 ng de cada enantiômero mL⁻¹. Essas amostras foram analisadas com base em curvas analíticas preparadas com dados de amostras processadas por LPME, em duplicata para cada concentração.

3.1.2.5.3. Recuperação

A recuperação do método foi avaliada analisando amostras de 1 mL de plasma branco fortificadas com *rac*-MRT, *rac*-DMR e *rac*-8-OHM nas concentrações plasmáticas de 2,50; 50 e 100 ng de cada enantiômero mL⁻¹, em triplicata para cada concentração, e processadas de acordo com o procedimento de preparação de amostras previamente estabelecido. 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 é dada como:

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

3.1.2.5.4. Precisão (repetibilidade) e exatidão

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

A precisão é dada como:

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

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.

A exatidão é normalmente expressa em função da porcentagem do erro relativo (Quattrocchi; Andrizzi; Laba, 1992).

A exatidão é dada como:

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

3.1.2.5.4.1. Precisão e exatidão intra-ensaio

Alíquotas de 1 mL de plasma branco fortificadas com *rac*-MRT, *rac*-DMR e *rac*-8-OHM nas concentrações plasmáticas de 2,5, 50 e 100 ng de cada enantiômero mL⁻¹ em quintuplicata, foram submetidas ao processo de extração e analisadas frente a curvas analíticas preparadas, em duplicata, nas mesmas concentrações plasmáticas descritas acima. Todas as amostras foram fortificadas com 25 µL da solução-padrão de HAL na concentração plasmática de 31,25 ng mL⁻¹. As amostras e a curva analítica foram preparadas e avaliadas no mesmo dia.

3.1.2.5.4.2. Precisão e exatidão interensaios

Alíquotas de 1 mL de plasma branco fortificadas com *rac*-MRT, *rac*-DMR e *rac*-8-OHM nas concentrações plasmáticas de 2,5, 50 e 100 ng de cada enantiômero mL⁻¹ em quintuplicata, foram submetidas aos respectivos processos de extração e analisadas durante 3 dias consecutivos, empregando novas curvas analíticas a cada dia nas mesmas condições acima citadas. A solução do padrão interno (25 µL) foi adicionada em todas as amostras na mesma concentração plasmática (31,25 ng mL⁻¹).

3.1.2.5.5. Seletividade (supressão de ionização)

Uma vez que o MS-MS é uma técnica analítica que determina os compostos de interesse em função de suas massas de forma independente, problemas de interferência no tempo de retenção geralmente não são muito relevantes; entretanto, nessa etapa, é fundamental avaliar possíveis efeitos de supressão de ionização induzida por outros fármacos que poderiam estar presentes em amostras reais obtidas de voluntários sadios ou pacientes e/ou componentes endógenos da matriz plasmática que co-eluem e/ou eluem num tempo de retenção muito próximo dos compostos de interesse e que podem interferir na quantificação.

Dessa forma, a supressão de ionização induzida por outros fármacos foi avaliada comparando as áreas dos compostos de interesse presentes em amostras de plasma branco

fortificadas unicamente com esse compostos e amostras de plasma forticadas com os compostos de interesse e adicionada de outros fármacos. Por sua vez, a supressão induzida pelos componentes endógenos da matriz foi avaliada verificando oscilações, positivas ou negativas, no sinal produzido pela infusão continua de uma solução-padrão dos compostos de interesse após injeção de uma amostra de plasma branco. Todas as amostras foram submetidas ao procedimento de extração.

3.1.2.5.6. Estudo de estabilidade

Estabelecidas às condições cromatográficas e de preparação das amostras, o método desenvolvido 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.

3.1.2.5.6.1. Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento

Para verificação dessa estabilidade, foram empregadas três amostras de plasma branco fortificadas com *rac*-MRT, *rac*-DMR e *rac*-8-OHM em duas concentrações: baixa (2,5 ng de cada enantiômero mL⁻¹) e alta (100 ng de cada enantiômero 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 12 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. Após o último descongelamento, o padrão interno foi adicionado as amostras antes das extrações.

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

3.1.2.5.6.2. Estabilidade nas mesmas condições de tempo e análise

Três amostras de plasma branco fortificado com *rac*-MRT, *rac*-DMR e *rac*-8-OHM nas concentrações plasmáticas de 2,5 e 100 ng de cada enantiômero 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). Após as 12 horas, o padrão interno foi adicionado às amostras e então elas foram submetidas ao procedimento de extração e análise.

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

3.1.2.6. Aplicação do método de LPME/LC-MS-MS no estudo de disposição cinética

Com a finalidade de avaliar a eficiência e aplicabilidade do método previamente desenvolvido e validado, os enantiômeros da MRT, DMR e OHM foram determinados em amostras de plasma coletadas de um voluntário sadio, do sexo masculino, com idade de 29 anos e 79 kg de peso, após a administração matinal (12 horas de jejum) de uma dose oral de 45 mg da *rac*-MRT (Remeron[®], N.V. Organon). As amostras de sangue foram retiradas antes da dosagem e 0,15; 0,30; 0,45; 1,0; 1,15; 1,30; 1,45; 2,0; 2,30; 3,0; 3,30; 4,0; 6,0; 8,0; 10; 12; 24; 36; 48; 58 e 72 horas após a administração do fármaco, usando heparina como anticoagulante. As amostras de sangue foram centrifugadas por 10 minutos a 2000 x g, os plasmas foram separados e armazenados a -20 °C até sua análise (n=2). O voluntário, previamente informado e esclarecido acerca do estudo, consentiu, por escrito, em participar da investigação, a qual foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (CEP-FCFRP/USP, process number 03/2003) (Anexo 1).

3.2. Análise enantiosseletiva de MRT e seus metabólitos em urina

Método LPME/CE

3.2.1. Materiais

3.2.1.1. Reagentes e Solventes

Os sais fosfato monossódico monohidratado, fosfato dissódico dihidratado, acetato de sódio e ácido bórico, obtidos da Merck (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), bem como, o fosfato trissódico dodecahidratado, obtido da Vetec Química Fina Ltda (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil), o TRIS (hidroximetil)aminometano, obtido da J.T.Baker (Phillipsburg, New Jersey, EUA) e o borato de sódio, obtido da Mallinckrodt Baker (Paris, Kentucky, EUA) foram todos grau p.a. Estes sais juntamente com o ácido acético obtido da Cinética Reagentes & Soluções (Jandira, São Paulo, Brasil) e o ácido fosfórico obtido da Labsynth Ltda (Diadema, São Paulo, Brasil), ambos grau p.a., foram empregados na preparação das soluções de eletrólitos e/ou na etapa de preparação das amostras. Todas as soluções foram armazenadas a 4 °C por no máximo 5 dias.

O éter n-hexílico obtido da Alfa Aesar (Ward Hill, Massachusetts, EUA), metanol, obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha), NaOH, obtido da Nuclear (São Paulo, São Paulo,

Brasil) e cloreto de sódio obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha) completam a lista de reagentes e solventes utilizados na etapa de otimização dos procedimentos de extração, todos no mínimo grau p.a.

A enzima β -glucuronidase obtida a partir da *Helix pomatia* (HP-2) e contendo 122700 unidades mL^{-1} de β -glucuronidase e 1150 unidades mL^{-1} de sulfatase, usada no procedimento de hidrólise enzimática das amostras de urina humana, foi fornecida pela Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA).

3.2.1.2. Soluções-padrão

Com exceção da lidocaina (LID) fornecida pela Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA) (Figura 11), os demais compostos utilizados na preparação das soluções-padrão foram os mesmos descritos na seção 3.1.1.2; entretanto, as soluções-padrão de *rac*-MRT, *rac*-DMR e *rac*-8-OHM utilizadas para o trabalho cotidiano foram preparadas nas concentrações de 5 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Por sua vez, a solução-padrão de LID foi preparada na concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as soluções foram preparadas e armazenadas conforme descrito na seção 3.1.1.2.

Figura 11. Estrutura do padrão interno LID.

As demais soluções-padrão dos compostos empregados no estudo de seletividade do método foram preparadas em metanol, na concentração de 1 mg mL^{-1} .

3.2.1.3. Equipamento

3.2.1.3.1. Sistema eletroforético

As análises eletroforéticas foram conduzidas empregando um equipamento da marca Agilent Technologies (Waldbrook, Alemanha), composto de um analisador modelo G1600A e um detector por arranjo de diodos com lâmpada de deutério, operando em 205 nm. As injeções foram realizadas através de um amostrador automático e o equipamento foi

controlado pelo *software* Agilent Chemstation, que também foi utilizado para aquisição e tratamento dos dados.

3.2.1.3.2. Equipamentos empregados na preparação das amostras

Antes da extração, as amostras de urina humana foram hidrolisadas para liberar a fração ligada do fármaco e de seus metabólitos através de aquecimento em um banho-maria Dubnoff, da marca Marconi, modelo MA093 (Piracicaba, São Paulo, Brasil). Após hidrólise, as amostras foram pré-tratadas por LPME usando os mesmos equipamentos descritos na seção 3.1.1.4.3. para o método LPME/LC-MS-MS.

3.2.1.4. Capilares

Os capilares de sílica fundida revestidos externamente com uma camada de poliimida foram provenientes da Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha). Foram avaliados capilares de 50 μm e 75 μm de diâmetro interno e comprimentos variáveis. A janela óptica de detecção ($\approx 0,5$ cm de comprimento) foi obtida pela remoção do revestimento de poliimida a 8 cm de uma das extremidades do capilar, através da aplicação de calor. O material queimado foi removido com o auxílio de um algodão embebido em metanol.

3.2.1.5. Seletores quirais

Vários seletores quirais baseados em CD e alguns outros foram avaliados no modo de polaridade normal e reversa, frente a diversas condições eletroforéticas de análise, com o objetivo de selecionar o seletor quiral mais apropriado para a separação enantiomérica do fármaco e de seus dois principais metabólitos, visando obter picos simétricos e tempos de análise considerados adequados para análises de rotina.

- Carboximetil- β -CD (CM- β -CD) - CD aniônica, obtida da Fluka (Buch, Suíça), empregada no modo de polaridade normal;
- 2-Hidroxipropil- β -CD (HP- β -CD) - CD neutra, obtida da Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA), empregada no modo de polaridade normal;
- Sal sódico de β -CD Sulfatada (β -CD sulfatada) - CD aniônica, obtida da Fluka (Buch, Suíça), empregada no modo de polaridade normal e reversa;
- Deoxicolato de sódio (DC) - sal biliar, obtido da Cydex (Calabasas, California, EUA), empregado no modo de polaridade reversa.

3.2.1.6. Amostras de urina

As amostras de urina humana, livres da MRT, DMR, 8-OHM e LID, denominadas amostras de urina branca, foram fornecidas por voluntários sadios 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 x g para a remoção de partículas suspensas.

3.2.2. Métodos

3.2.2.1. Condicionamento de capilares novos

Antes do primeiro uso, os capilares novos foram condicionados com:

- 1- Solução de NaOH 1 mol L⁻¹ a 30 °C durante 1 minuto;
- 2- Solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ a 20 °C durante 10 minutos;
- 3- Água Milli-Q PLUS[®] a 20 °C durante 10 minutos;

3.2.2.2. Condicionamento do capilar no início das análises e entre análises; substituição do tampão de análise e restauração do capilar

No início do dia, o capilar era condicionado com uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ durante 10 minutos a 20 °C, seguido de uma etapa de lavagem com água Milli-Q PLUS[®] nas mesmas condições. Entre cada análise, o capilar era condicionado com uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ durante 2 minutos, seguido de uma etapa de lavagem com água Milli-Q PLUS[®] durante 2 minutos e outra com tampão de análise durante 5 minutos. A cada 9 análises, a solução tampão de análise era substituída. Quando necessário, a restauração do capilar foi realizada com uma solução de NaOH 1 mol L⁻¹ durante 10 minutos a 20 °C e água Milli-Q PLUS[®] nas mesmas condições.

O condicionamento do capilar antes de cada análise e a substituição das soluções tampão empregadas na análise, após um determinado número de análises, são parâmetros essenciais, em alguns casos, para a adequada resolução dos picos e para garantir a repetibilidade nos tempos de migração e nas áreas dos picos dos compostos de interesse.

3.2.2.3. Armazenamento do capilar

Ao final das análises, o capilar em uso era lavado com uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ durante 4 minutos a 20 °C sendo seguido de uma etapa de lavagem com água Milli-Q PLUS[®] nas mesmas condições. Durante o armazenamento, as extremidades do capilar permaneciam imersas em água Milli-Q PLUS[®].

3.2.2.4. Avaliação dos seletos quirais empregados em CE

A resolução eletroforética foi avaliada empregando alíquotas de 25 µL das soluções-padrão de *rac*-MRT, *rac*-DMR, *rac*-8-OHM na concentração de 200 µg mL⁻¹. Após evaporação do solvente sob fluxo de ar comprimido, os resíduos foram dissolvidos em 50 µL da solução tampão de injeção, constituída pelo tampão de análise diluído dez vezes com água Milli-Q PLUS[®]. Nessa etapa foram otimizados vários parâmetros: seletor quiral, composição do tampão de análise (fosfato, acetato e/ou borato) em diferentes concentrações e valores de pHs, pré-condicionamento do capilar, temperatura de análise, modo de injeção (tempo e pressão), voltagem aplicada e polaridade.

3.2.2.5. Condições eletroforética para análise enantiosseletiva da mirtazapina de seus dois principais metabólitos

A melhor resolução dos enantiômeros da MRT, DMR, 8-OHM e da LID foi alcançada empregando uma solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ (pH ajustado a 2,5 com uma solução de ácido fosfórico 3 mol L⁻¹) contendo CM-β-CD 0,55% (m/v). Todos os experimentos foram realizados no modo normal. As amostras foram hidrodinamicamente injetadas, a pressão de 50 mbar, por 20 segundos. Durante as análises, o capilar de sílica foi mantido a temperatura de 25 °C e a voltagem aplicada foi de +25 kV.

3.2.2.6. Ordem de eluição

A ordem de eluição dos enantiômeros da MRT, DMR e 8-OHM, foi definida analisando os enantiômeros opticamente puros isolados por HPLC semipreparativa sob as mesmas condições eletroforéticas estabelecidas na seção 3.2.2.5.

3.2.2.7. *Reação de hidrólise*

Na urina humana, o fármaco e seus metabólitos encontram-se preferencialmente na forma conjugada com o ácido glicurônico (principalmente os análogos 8-hidroxi) ou com o ácido sulfúrico (principalmente a DMR). Devido a isso e, a ausência, em nosso laboratório, de padrões do fármaco e dos metabólitos conjugados com o ácido glicurônico e/ou ácido sulfúrico, foi necessário incluir uma etapa prévia de hidrólise das amostras.

Para tanto, foram avaliadas as hidrólises básica, ácida e enzimática. Nesta etapa, foram realizadas análises de amostras de urina coletadas de um voluntário sadio 8 horas após administração de 45 mg do fármaco Remeron[®]. Antes da etapa de pré-tratamento, essas amostras foram adicionadas de um agente hidrolisante ácido (HCL), básico (NaOH) ou enzimático (β -glucuronidase contendo uma quantidade substancial de arilsulfatases obtida a partir da *Helix pomatia*, HP-2) e deixadas sob agitação em banho maria por um tempo determinado. Na etapa de otimização da reação de hidrólise foram avaliados alguns parâmetros como: (i) temperatura; (ii) agitação; (iii) tempo, (iv) quantidade do agente hidrolisante e (v) volume de urina.

Ao final da hidrólise, o pH das amostras foi ajustado para valores entre 8-10. Além disso, o padrão interno foi adicionado somente após a hidrólise para evitar degradação do mesmo por ação do calor.

3.2.2.8. *Procedimento de preparação da amostra*

A extração da *rac*-MRT e seus metabólitos das amostras de urina foi feita empregando o método previamente otimizado para plasma (seção 4.1.3.), após algumas adaptações e incluindo a etapa de hidrólise. Ao término da extração, a fase aceptora foi diretamente injetada e analisada por CE, sob as condições eletroforéticas apresentadas na seção 3.2.2.5.

A otimização foi feita utilizando 1 mL de urina branca fortificada com 25 μ L de soluções-padrão de *rac*-MRT, *rac*-DMR e *rac*-8-OHM na concentração urinária de 500 ng de cada enatiômero mL⁻¹ e padrão interno. Assim como para as amostras de plasma, alíquotas de (i) urina branca e (ii) de 3 mL de água purificada no sistema Milli-Q PLUS[®], foram processadas nas mesmas condições acima descritas para verificar a presença de interferentes endógenos na urina humana e a pureza dos reagentes. Todas as extrações foram realizadas a 35 °C $\pm$ 2.

3.2.2.9. Validação

O método desenvolvido foi validado segundo as mesmas recomendações empregadas para o método descrito na seção 3.1.2.5. Amostras de urina branca (1 mL) previamente centrifugadas e fortificadas com 25 μL das soluções-padrão de *rac*-MRT e *rac*-8-OHM nas concentrações urinárias de 62,5; 125; 312,5; 625; 1250 e 2500 ng de cada enantiômero mL^{-1} e *rac*-DMR nas concentrações urinárias de 62,5; 125; 312,5; 625; 1250 e 1250 ng de cada enantiômero mL^{-1} e 25 μL da solução-padrão de LID na concentração urinária de 1000 ng mL^{-1} foram utilizadas para a construção das curvas analíticas. Para a determinação do LQ empregou-se 5 alíquotas de uma amostra de urina fortificada com 62,5 ng de cada enantiômero mL^{-1} . Além dessas, amostras de urina branca (1 mL) previamente centrifugadas e fortificadas com 25 μL das soluções-padrão de *rac*-MRT e *rac*-8-OHM nas concentrações urinárias de 100, 875 e 1750 ng de cada enantiômero mL^{-1} e *rac*-DMR nas concentrações urinárias de 100, 500, 1000 ng de cada enantiômero mL^{-1} também foram utilizadas na avaliação da recuperação, exatidão, precisão e estabilidade.

A seletividade do método foi avaliada analisando 25 μL das soluções-padrão de vários compostos (1 mg mL^{-1}) sob as mesmas condições eletroforéticas descritas para a MRT e seus principais metabólitos. Nos casos em que o tempo de migração do fármaco (t_m) foi similar ao dos enantiômeros do fármaco e seus dois principais metabólitos, o experimento foi repetido após submeter o composto ao procedimento de extração.

3.2.2.10. Aplicação dos métodos no estudo de taxa de excreção urinária

Para avaliar a aplicabilidade do método previamente desenvolvido e validado, a taxa de excreção urinária dos enantiômeros da MRT, DMR e 8-OHM foi determinada em amostras de urina coletadas de um voluntário sadio, do sexo masculino, com idade de 29 anos e 79 kg de peso, após a administração matinal (12 horas de jejum) de uma dose oral de 45 mg da *rac*-MRT (Remeron[®], N.V. Organon). As amostras de urina foram coletadas antes da dosagem e nos intervalos de tempo de 0-4, 4-8, 12-16, 16-24, 24-48, 48-54 e 54-72 horas após a administração do fármaco. O volume das amostras de urina foi medido e alíquotas de 10 mL foram armazenadas a -20 °C até sua análise (n=2). O voluntário, previamente informado e esclarecido acerca do estudo, consentiu, por escrito, em participar da investigação, a qual foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (CEP-FCFRP/USP, processo número 03/2003) (Anexo 1).

3.3. Análise enantiosseletiva de MRT e seus metabólitos em urina

Método SPME

A etapa de otimização do procedimento de extração por SPME foi feita empregando o método de análise anteriormente desenvolvido e descrito na seção 3.2. Por não ter sido possível obter detectabilidade conveniente dos enantiômeros do fármaco e seus metabólitos empregando a eletroforese capilar como técnica de análise, as etapas de validação e aplicação do método foram feitas usando a LC-MS-MS, de acordo com o descrito na seção 3.1. Sendo assim, detalharemos aqui apenas os materiais e os métodos empregados na etapa de extração por SPME.

3.3.1. Materiais

3.3.1.1. Reagentes e Solventes

Os sais fosfato monossódico monohidratado, fosfato dissódico dihidratado, obtidos da Merck (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), bem como, o fosfato trissódico dodecahidratado, obtido da Vetec Química Fina Ltda (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil), foram todos grau p.a.. Estes sais juntamente com o ácido fosfórico obtido da Labsynth Ltda (Diadema, São Paulo, Brasil), grau p.a., foram empregados na etapa de preparação das amostras. Todas as soluções foram armazenadas a 4 °C por no máximo 5 dias.

O metanol (grau cromatográfico) e cloreto de sódio (grau p.a) obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) completam a lista de reagentes e solventes utilizados na etapa de otimização dos procedimentos de extração.

3.3.1.2. Equipamentos

Nos experimentos envolvendo a técnica de SPME foram empregados um agitador magnético com aquecimento da marca Marconi, modelo TE 085 (Piracicaba, São Paulo, Brasil) e um amostrador da marca Supelco (Bellefonte, Pennsylvania, EUA). Nesses experimentos foram utilizadas fibras comerciais recobertas com 60 µm de polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB) e 50 µm de *carbowax-templated resin* (CW-TPR), fornecidas pela Supelco (Bellefonte, PA, EUA).

3.3.2. Métodos

3.3.2.1. Otimização do procedimento de extração

O procedimento de extração foi otimizado avaliando a influência do tipo de fibra (PDMS-DVB ou CW-TRP) da alcalinização da amostra (com tampão pH 8-12), da adição de NaCl (0 a 30%) do tempo (15 a 60 min) e temperatura de extração (25 a 80 °C) e do tempo de desorção (1 a 7 min). Nas condições otimizadas, as amostras de urina hidrolizada (seção 4.2.4.1.) foram alcalinizadas com 2 mL de uma solução tampão fosfato de sódio 1 mol L⁻¹ (pH ajustado para 11 com ácido fosfórico 3 mol L⁻¹), resultando em pH de aproximadamente 8. A extração foi realizada pela imersão direta da fibra na amostra de urina por 30 min, à temperatura ambiente (23 (±2) °C) e sob agitação constante (1100 rpm) usando uma barra cilíndrica de agitação magnética (10 × 4 mm). Após a extração, a fibra foi recolhida para o interior da agulha, removida do recipiente de extração e inserida em um recipiente de vidro contendo 100 µL de metanol. Após desorção por 1 min, a fibra foi recolhida para o interior da agulha. O solvente de desorção foi evaporado até completa secura sob fluxo de ar comprimido, à temperatura ambiente. Para as análises por CE, os resíduos foram dissolvidos em 25 µL do tampão de análise. Nas análises por LC-MS-MS, os resíduos foram dissolvidos em 35 µL de fase móvel e 20 µL foram cromatografados. Um esquema ilustrativo dos princípios básicos de SPME está apresentado na Figura 12.

Figura 12. Esquema ilustrativo dos princípios básicos da SPME. (A) corresponde a amostra de interesse e (M) corresponde a matriz biológica.

3.3.2.2. Validação

Amostras de 1 mL de urina branca fortificadas com *rac*-MRT, *rac*-DMR e *rac*-8-OHM nas concentrações urinárias de 62,5; 125; 312,5; 625; 1250 ng mL⁻¹ e 25 µL de HAL na concentração urinária de 31,25 ng mL⁻¹, em duplicata para cada concentração, foram utilizadas na construção de curvas analíticas empregadas na validação do método por SPME.

A recuperação do método foi avaliada analisando amostras de 1 mL de urina branca fortificadas com *rac*-MRT, *rac*-DMR e *rac*-8-OHM nas concentrações de 75, 875 e 1750 ng de cada enantiômero mL⁻¹ e processadas empregando o procedimento de extração otimizado. Antes da análise cromatográfica a fase aceptora era acrescida de 25 µL da solução-padrão de HAL.

A precisão e exatidão do método foram avaliadas usando amostras de urina fortificadas com *rac*-MRT, *rac*-DMR e *rac*-8-OHM nas concentrações de 75, 437,5 e 875 ng de cada enantiômero mL⁻¹. O limite de quantificação foi determinado fortificando amostras de urina (n=5) na concentração urinária de 62,5 ng de cada enantiômero mL⁻¹ da MRT, DMR e 8-OHM.

Na avaliação da estabilidade do método foram empregadas amostras de urina branca (n=3) fortificadas com *rac*-MRT, *rac*-DMR e *rac*-8-OHM em duas outras concentrações: baixa (75 ng de cada enantiômero mL⁻¹) e alta (1750 ng de cada enantiômero mL⁻¹).

3.3.2.3. Aplicação do método de SPME/LC-MS-MS no estudo de disposição cinética

A aplicação do método foi avaliada pela análise da taxa de excreção acumulada dos enantiômeros da MRT, DMR e 8-OHM em amostras de urina coletadas de um voluntário sadio, do sexo masculino, com idade de 29 anos e 79 kg de peso, após a administração matinal (12 horas de jejum) de uma dose oral de 45 mg da *rac*-MRT (Remeron®, N.V. Organon). As amostras de urina foram coletadas antes da dosagem e nos intervalos de tempo de 0-4, 4-8, 12-16, 16-24, 24-48, 48-54 e 54-72 horas. O volume de urina coletada em cada intervalo de tempo foi medido e alíquotas de 10 mL foram armazenadas a -20 °C até sua análise (n=2). O voluntário, previamente informado e esclarecido acerca do estudo, consentiu, por escrito, em participar da investigação, a qual foi aprovada pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (CEP-FCFRP/USP, processo número 03/2003) (Anexo 1).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise enantiosseletiva de MRT e seus metabólitos em plasma método LPME/LC-MS-MS

4.1.1. Avaliação das colunas quirais

Na avaliação das diversas fases móveis usadas nas colunas quirais foi necessário considerar 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. Uma vez que a detecção foi feita por espectrometria de massas no modo MRM, a determinação dos compostos foi conduzida separadamente pelo monitoramento de cada molécula protonada e seu respectivo produto de fragmentação (Figura 13). Dessa forma, não houve a preocupação com possíveis co-eluições entre os enantiômeros do fármaco e de seus dois principais metabólitos, nem com interferentes endógenos presentes no plasma.

Na escolha da fase estacionária quiral mais adequada para a enantioseparação dos compostos foram avaliadas as colunas Chiralpak AD e a Chiralpak AD-RH. Essas colunas quirais são obtidas a partir da incorporação do derivado tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose em partículas de sílica de 10 e 5 μm , respectivamente. Nessas colunas, a discriminação quiral acontece devido ao encaixe dos enantiômeros nas camadas das hélices dos polímeros, além de interações específicas com os grupos introduzidos na derivação do polissacarídeo (Okamoto; Yashima, 1998).

Estudos preliminares em nosso laboratório haviam mostrado que era possível obter uma considerável redução no tempo total de análise de fármacos e seus metabólitos empregando o modo de eluição polar orgânico, caracterizado pelo uso de fases móveis constituídas apenas por solventes orgânicos polares. Além disso, os solventes orgânicos polares são de fácil evaporação e extremamente compatíveis com o MS-MS quando comparado com as fases móveis reversas utilizadas em colunas quirais e fases móveis normais constituídas de hexano. Sendo assim, essas colunas foram avaliadas em condições de fase polar orgânica, usando acetonitrila, metanol, etanol e misturas desses solventes em diferentes proporções. DEA e TFA também foram adicionados a essas fases móveis com o objetivo de reduzir a interação do fármaco e seus metabólitos básicos com os grupos silanóis do suporte de sílica. A adição de DEA em todas as fases móveis foi essencial na separação dos

enantiômeros do fármaco e dos seus dois principais metabólitos, independentemente da concentração utilizada. Por outro lado, a adição de TFA na fase móvel não mostrou qualquer melhora nas separações enantioméricas.

Figura 13. Espectros de massas dos produtos resultantes da fragmentação das moléculas protonadas da 8-OHM, DMR, MRT e HAL.

Figura 13, continuação. Espectros de massas dos produtos resultantes da fragmentação das moléculas protonadas da 8-OHM, DMR, MRT e HAL.

4.1.1.1. Coluna Chirapak AD

Como justificado acima, todas as fases móveis avaliadas foram constituídas de solventes orgânicos polares. Nessas condições, observou-se que um aumento na polaridade do solvente orgânico usado como fase móvel resultava em uma redução considerável nos tempos

de retenção dos compostos, as custas de uma perda significativa nos fatores de separação dos enantiômeros. Para resolver esse problema foram avaliadas fases móveis constituídas por misturas de acetonitrila, etanol e metanol, em diferentes proporções; embora tenha ocorrido uma melhora na separação dos enantiômeros dos compostos estudados, nenhuma das fases móveis foi adequada para garantir parâmetros cromatográficos satisfatórios para a separação da DMR, principalmente o número de pratos (Tabela 3).

4.1.1.2. Coluna Chiralpak ADR-H

A resolução satisfatória dos enantiômeros da MRT, DMR e 8-OHM e do padrão interno (HAL) sob as mesmas condições cromatográficas foi possível na coluna Chiralpak ADR-H. Nessa coluna, observou-se que o aumento da polaridade da fase móvel, variando a proporção do álcool metílico em relação a acetonitrila, levou a uma melhora significativa na resolução dos picos dos enantiômeros do metabólito hidroxilado (8-OHM), sem prejudicar a separação enantiomérica dos outros compostos. Entretanto, somente com o acréscimo de etanol na fase móvel foi possível obter a completa resolução enantiomérica de todos os compostos. As Tabelas 2 e 3 mostram, respectivamente, as fases móveis avaliadas na coluna Chiralpak ADR-H e os parâmetros cromatográficos de fator de retenção (k), fator de separação (α), número de pratos (N) e resolução (R_s) obtidos sob as condições cromatográficas ótimas para a simultânea resolução enantiomérica de todos os compostos. Os cromatogramas da Figura 14 mostram separações obtidas com tempos de retenção relativamente curtos, sendo que todos os compostos eluíram com tempos de retenção menores que 8 minutos.

Tabela 2. Fases móveis avaliadas para a coluna Chiralpak ADR-H durante a otimização das condições cromatográficas em LC-MS-MS.

Coluna Quiral	Fase Móvel
Chiralpak ADR-H	Acetonitrila:metanol (85:15, v/v) + DEA (0,2%, v/v)
	Acetonitrila:metanol (90:10, v/v) + DEA (0,2%, v/v)
	Acetonitrila:metanol (95:5, v/v) + DEA (0,2%, v/v)
	Acetonitrila:metanol:etanol (90:5:5, v/v/v) + DEA (0,2%, v/v)*

*Fase móvel selecionada para o estudo dos parâmetros cromatográficos

Tabela 3. Parâmetros cromatográficos obtidos nas colunas Chiralpak AD e Chiralpak AD-RH para os enantiômeros da MRT, DMR e 8-OHM.

Fármaco/Metabólitos	Parâmetros cromatográficos				
	<i>N</i>	<i>R_s</i>	<i>F</i>	<i>k₁</i>	α
Chiralpak AD					
MRT	2116	2,00	1,0	0,72	1,59
DMR	841	1,89	1,0	0,98	1,67
8-OHM	1193	1,43	1,0	0,49	1,30
Chiralpak AD-RH					
MRT	1156	2,00	1,0	1,06	1,70
DMR	2916	4,53	1,0	1,72	1,80
8-OHM	1111	1,11	1,0	0,86	1,33

N, número de pratos; *R_s*, resolução; *F*, vazão (mL min^{-1}); *k₁*, fator de retenção para o primeiro enantiômero eluído (*t_m*, tempo de retenção de um composto não retido, foi calculado como $t_m = V_m/F$, onde *V_m* é volume da fase móvel dentro da coluna e *F* é a vazão. *V_m* (mL) foi estimado em função do comprimento *L* (cm) e diâmetro interno *d_c* (cm) da coluna como $V_m = 0,5Ld_c^2$); α , fator de separação.

Figura 14. Separação do (A) HAL e dos enantiômeros da (B) 8-OHM, (C) MRT e (D) DMR na coluna Chiralpak AD-RH. As análises foram realizadas empregando acetonitrila:metanol:etanol (90:5:5, v/v/v) mais 0,2% de DEA, na vazão de 1 mL min^{-1} .

4.1.2. Determinação da ordem de eluição

Os cromatogramas da *rac*-MRT, *rac*-DMR e *rac*-8-OHM, obtidos por cromatografia líquida com detecção por CD e utilizados na determinação da ordem de eluição dos

enantiômeros do fármaco e seus dois principais metabólitos mostram concordância com o perfil observado nos espectros de CD dos enantiômeros opticamente puros dissolvidos em metanol. Por sua vez, os espectros de CD dos isômeros (-)-(R)- e (+)-(S)-MRT (Figura 15A) são semelhantes aqueles descritos anteriormente por Moody *et al.* (2002), nos quais a (-)-(R)-MRT tem um efeito Compton negativo em 253 nm e o espectro de CD do isômero (+)-(S)-aparece quase especular ao do seu antípoda. Portanto, este perfil sugere que o centro esterogênico na MRT dá origem a maior parte do sinal de CD observado. Dessa forma, sob as condições experimentais adotadas, a (-)-(R)-MRT elue primeiro e a (+)-(S)-MRT foi o segundo pico eluido na coluna Chiralpak AD-RH[®]. A configuração absoluta dos dois principais metabólitos da MRT foi determinada avaliando os espectros de CD das frações enantioméricas dos metabólitos em metanol e comparando os resultados com aqueles obtidos para o composto inalterado. O mesmo perfil de CD, isto é, sinal negativo para o primeiro enantiômero eluido e positivo para o segundo enantiômero, foi observado para o metabólito 8-OHM (Figura 15B). Portanto, a mesma ordem de eluição pode ser sugerida para os enantiômeros da MRT e para o seu metabólito 8-OHM. Entretanto, um perfil de CD oposto, isto é, sinal positivo para o primeiro enantiômero eluido e negativo para o segundo enantiômero, foi observado para o metabólito DMR, sugerindo uma ordem de eluição inversa para os enantiômeros desse metabólito (Figura 15C).

Figura 15. Cromatogramas (detecção CD a 253 nm) e espectros de CD da (-)-(R)- e (+)-(S)- da MRT (A), 8-OHM (B) e DMR (C). As condições cromatográficas são apresentadas na seção 3.1.2.2.

Figura 15, continuação. Cromatogramas (detecção CD a 253 nm) e espectros de CD da $(-)-(R)-$ e $(+)-(S)-$ da MRT (A), 8-OHM (B) e DMR (C). As condições cromatográficas são apresentadas na seção 3.1.2.2.

4.1.3. Otimização dos parâmetros de extração Líquido-Líquido

A limitada capacidade de recuperação normalmente apresentada pelas técnicas de microextração que dificultam a determinação de baixos valores de concentração nos motivou

a avaliar inicialmente a LLE por ser uma técnica que geralmente oferece elevada recuperação ($\cong 90\%$). Essa necessidade torna-se ainda maior na avaliação do perfil farmacocinético enantiosseletivo da MRT que exige a quantificação do fármaco e seus dois principais metabólitos no intervalo de 1 a 100 ng de cada enantiômero mL^{-1} (Timmer; Sitsen; Delbressine, 2000).

A LLE consiste basicamente da partição do composto entre dois líquidos imiscíveis, sendo normalmente, um deles a matriz aquosa e o outro um solvente extrator orgânico. Esse solvente extrator deve ser capaz de extrair seletivamente o composto da matriz, minimizando a passagem dos demais componentes para a fase orgânica, e ser facilmente evaporado após a separação do composto da matriz.

A LLE é influenciada pelo tipo de solvente extrator, pH da fase aquosa e razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa (Mcdowall, 1989; Peng; Chiou, 1990). Dessa forma, os principais parâmetros otimizados na etapa de avaliação da LLE foram o tipo de solvente extrator e o pH da fase aquosa. Na otimização do procedimento, a LLE foi empregada em amostras de plasma branco, livre do fármaco; plasma branco fortificado após a extração; branco de reagentes e amostras fortificadas com a *rac*-MRT, a *rac*-DMR, *rac*-8-OHM e padrão interno para investigar a interferência de agentes endógenos do plasma e a possibilidade de interferência dos reagentes empregados na extração.

4.1.3.1. Solvente orgânico

As condições inicialmente empregadas na extração buscaram mimetizar as melhores condições obtidas anteriormente em nosso laboratório para a extração da MRT por LLE (de Santana, Cesarino, Bonato, 2004). Sendo assim, na escolha do solvente extrator foram avaliados: tolueno; clorofórmio:tolueno (1:1, v/v); acetato de etila:tolueno (1:1, v/v); diclorometano:tolueno (1:1, v/v); álcool isoamílico:tolueno (2:8, v/v) e éter diisopropílico. Assim como era esperado, o solvente tolueno permitiu uma eficiente extração da MRT, bem como do metabólito DMR, mas, por outro lado, observou-se uma mínima extração do metabólito 8-OHM e MIA (fármaco empregado como padrão interno nas análises conduzidas por LLE/LC-MS-MS). Por sua vez, um aumento na polaridade da fase extratora com a adição de acetato de etila e álcool isoamílico (acetato de etila:tolueno, 1:1, v/v e álcool isoamílico:tolueno, 2:8, v/v), possibilitou uma adequada extração de todos os compostos de interesse presentes na matriz aquosa. Além desses, o uso de éter diisopropílico também mostrou ser uma alternativa viável na recuperação dos compostos de interesse.

4.1.3.2. Ajuste do pH da matriz

Na LLE, o pH das amostras é considerado um fator determinante e, na sua escolha devem ser levados em consideração a estabilidade e o caráter ácido-base do composto, uma vez que, para que haja uma extração eficaz, o fármaco deve permanecer na forma não dissociada e assim, favorecer sua partição para o solvente orgânico. Com essa finalidade foi proposta a alcalinização das amostras com 100 μL de NaOH 1,0 mol L^{-1} .

A alcalinização das amostras com soluções de NaOH garantiu uma elevada eficácia na extração dos compostos. Entretanto, uma avaliação cuidadosa dos cromatogramas obtidos mostrou que estava havendo supressão na ionização para o enantiômero (+)-(S)- do metabólito hidroxilado e para o enantiômero (+)-(S)- da MRT (Figura 16).

Figura 16. Cromatogramas mostrando o efeito da supressão de ionização quando as amostras eram extraídas por LLE (A) 8-OHM, (B) MRT, (C) MIA e (D) DMR na coluna Chiralpak AD-RH. As análises foram realizadas empregando acetonitrila:metanol:etanol (90:5:5, v/v/v) mais 0,2% de DEA na vazão de 1 mL min^{-1} .

A utilização de tampão fosfato de sódio 0,5 mol L^{-1} pH 8 e 11 ou hidróxido de amônio 1 mol L^{-1} na fase aquosa em substituição à solução de NaOH foi avaliada mas o problema de supressão de ionização ainda persistiu.

Assim sendo, embora a LLE tenha apresentado cromatogramas livres de interferentes plasmáticos e excelentes valores de recuperação para os enantiômeros do fármaco, dos seus dois principais metabólitos e do padrão interno, essa técnica não se mostrou viável para o objetivo pretendido de determinação e quantificação do fármaco e de dois dos seus principais metabólitos em um estudo de disposição cinética.

4.1.4. Otimização dos parâmetros de microextração em fase líquida empregando fibras ocas

4.1.4.1. Fibra oca

O polipropileno é o material comumente empregado na fabricação das fibras já que elas devem ser hidrofóbicas e compatíveis com uma grande variedade de solventes orgânicos. As fibras possuem diâmetro interno de 600 μm e as paredes 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 na agulha da microseringa. Poros com tamanhos de 0,2 μm foram selecionados para garantir uma eficiente microfiltração e a penetração unicamente de moléculas pequenas (compostos) (Figura 17).

Figura 17. Foto ilustrativa mostrando as reais dimensões de uma fibra oca com 8,0 cm de comprimento e empregada na LPME (indicada por uma seta).

4.1.4.2 Fase extratora

Em geral, vários solventes imiscíveis em água e 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 composto alvo (quando empregada a LPME de duas fases) e (iv) polaridade semelhante a da fibra oca, para facilitar sua imobilização nos poros (Psillakis; Kalogerakis, 2003). No presente trabalho foram avaliadas a LPME no modo duas e três fases. Assim, foram testados os solventes orgânicos acetato de etila, acetato de butila: acetato de hexila, acetato de dodecila, éter n-hexílico, n-octanol, iso-octanol e tolueno.

Inicialmente, a LPME foi empregada no modo duas fases, sob as mesmas condições anteriormente desenvolvidas em nosso laboratório (de Santana, de Oliveira, Bonato, 2005), usando tolueno como solvente extrator. Esse solvente não foi eficaz na extração dos metabólitos. Assim, devido aos promissores resultados mostrados para a extração do fármaco e de seus dois principais metabólitos empregando a LLE como técnica de extração, a fase extratora constituída de acetato de etila:tolueno (1:1, v/v), foi inicialmente avaliada frente a LPME de duas fases. Entretanto, essa fase extratora apresentou uma elevada taxa de evaporação do solvente acetato de etila, que levou a uma instabilidade da fase extratora, com conseqüente perda na extração dos metabólitos.

Por sua vez, os resultados empregando a LPME no modo três fases, usando uma solução de ácido acético $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, mostraram que o éter-hexílico foi o único solvente de extração capaz de proporcionar uma adequada extração de todos os compostos.

4.1.4.3. Fase aceptora

Uma vez que a MRT e seus dois principais metabólitos são compostos de caracter básico, quando a LPME foi usada no modo três fases, a fase aceptora foi acidificada para que o composto se tornasse protonado e não houvesse tendência de sua volta para o solvente retido na fibra. Quimicamente isto é similar a LLE em um solvente orgânico, seguido de uma extração de volta em uma segunda fase aquosa (Jönsson; Mathiasson, 2000). Para esse objetivo, foram avaliadas fases aceptoras compostas de soluções de ácido acético glacial, ácido perclórico, ácido trifluoroacético e ácido clorídrico em concentrações que variavam de 1 a $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. O emprego da solução de ácido acético glacial $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ como fase aceptora, possibilitou a melhor extração da MRT, DMR, 8-OHM e HAL e foi selecionada para os estudos posteriores.

Para evitar que uma solução aquosa fosse introduzida na coluna que estava sendo operada no modo polar orgânico, a fase aceptora foi submetida a uma etapa de evaporação

sob fluxo de ar comprimido, seguida da dissolução dos resíduos na fase móvel antes da análise cromatográfica.

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, seus dois principais metabólitos e o padrão interno são estáveis frente a evaporação empregando ar comprimido.

4.1.4.4. Tempo de extração

Assim como em SPME, a extração dos compostos 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 muito após o equilíbrio ter sido estabelecido, pois isso prolonga o procedimento de forma desnecessária. Também é possível realizar as extrações antes do equilíbrio ter sido atingido; nesse caso, é necessário um controle rigoroso do tempo de extração para que o procedimento seja reprodutível. Também é desejável que o tempo de extração seja o mais próximo possível do tempo gasto para a análise cromatográfica (Shen; Lee, 2002). Amostras de plasma fortificadas com o fármaco, os metabólitos foram extraídas durante períodos de tempo de 15 a 60 minutos, nos quais, o equilíbrio foi alcançado em 45 min, que foi escolhido para os experimentos subsequentes (Figura 18). Nesses experimentos, o padrão interno foi adicionado após o procedimento de extração e a razão de áreas foi usada para construção dos gráficos.

Figura 18. Efeito do tempo de extração na recuperação de 250 ng de cada enantiômero mL^{-1} da MRT, DMR e 8-OHM. Condições de extração: 35 °C; fibra de 6 cm; 1 mL de plasma 4 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,5 mol L^{-1} pH 8 (fase doadora); éter n-hexílico (fase extratora); 15 μL de solução de ácido acético glacial 0,01 mol L^{-1} (fase aceptora). As condições cromatográficas são apresentadas na seção 3.1.2.2. (n=3 para cada experimento).

4.1.4.5. Agitação da amostra

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

Uma agitação eficiente reduz o tamanho dessa camada e a difusão dos compostos 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, 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 ainda 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, acelerando a evaporação do solvente e introduzindo imprecisão nas medições (Pedersen-Bjergaard; Rasmussen, 2000; Shen; Lee, 2002). Assim sendo, para evitar esses possíveis inconvenientes, a agitação da fase doadora foi mantida constante através do emprego de um sonicador a 35 (± 2) °C.

4.1.4.6. Razão volumétrica das fases aceptora e doadora

Em geral, a recuperação do método empregando a LPME pode ser aumentada elevando a razão entre o volume do solvente imobilizado na fibra e o volume da fase doadora ($V_{\text{org}}/V_{\text{d}}$) (Ugland; Krogh; Rasmussen, 2000). 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, foram avaliadas fibras de 2 a 10 cm de comprimento, entre as quais, a fibra de 8 cm provou ser de fácil manuseio e com adequada eficiência de extração para a aplicação pretendida. A fibra de 2 cm mostrou-se adequada para a determinação de todos os compostos de interesse em concentrações próximas a 20 ng de cada enantiômero mL⁻¹, o que mostra os elevados fatores de enriquecimento obtidos pelo método de extração e a alta detectabilidade do método de determinação dos compostos.

Embora as fibras de 10 cm de comprimento tenham se apresentado mais eficientes na extração, suas maiores dimensões dificultam o manuseio durante a etapa experimental e exigem um volume maior de fase doadora para garantir a total imersão da fibra nessa fase.

4.1.4.7. Ajuste de pH

O ajuste do pH da amostra é crucial para a extração de compostos ácidos e básicos por LPME (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), empregou-se uma solução de NaOH 1 mol L⁻¹ e soluções tampão fosfato de sódio 0,05 e 0,5 mol L⁻¹, em dois diferentes pHs (8 e 11). Observou-se que tanto a adição da solução de NaOH 1 mol L⁻¹ quanto do tampão fosfato de sódio proporcionaram uma considerável recuperação dos enantiômeros do fármaco básico MRT e dos metabólitos estudados. Entre as soluções tampão avaliadas, aquela constituída de fosfato de sódio 0,5 mol L⁻¹ pH 8 foi selecionada para os estudos posteriores, pois mostrou uma eficiente capacidade tamponante da fase doadora e proporcionou uma faixa de pH básico adequado para a máxima extração dos compostos (Figura 19).

Figura 19. Efeito do pH da fase doadora na recuperação de 250 ng de cada enantiômero mL⁻¹ da MRT, DMR e 8-OHM. Condições de extração em LPME: 25 min; 35 °C; fibra de 6 cm; 1 mL de plasma; éter n-hexílico (fase extratora); 15 µL de solução de ácido acético glacial 0,01 mol L⁻¹ (fase aceptora); fase doadora: tampão fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹ pH 8; tampão fosfato de sódio 0,5 mol L⁻¹ pH 8; tampão fosfato de sódio 0,5 mol L⁻¹ pH 11. As condições cromatográficas são apresentadas na seção 3.1.2.2. (n=3 para cada experimento).

4.1.4.8. Modificadores orgânicos

Os enantiômeros da MRT são bastante ligados às proteínas plasmáticas (≥ 85%), o que pode reduzir sua recuperação a partir de fluidos biológicos (Timmer; Sitsen; Delbressine, 2000). Essas ligações fármaco-proteína ocorrem devido a interações iônicas, hidrofóbicas ou

mesmo polares. 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). Por outro lado, o metanol pode afetar a polaridade do meio e, conseqüentemente, a distribuição do composto entre a fase aquosa e o solvente orgânico, reduzindo a eficiência da extração. Nossos resultados, usando amostras de plasma adicionadas de 0-25% (v/v) de metanol, estão de acordo com estudos anteriores, que também não mostraram melhora na recuperação dos compostos (Figura 20) (Halvorsen; Pedersen-Bjergaard; Rasmussen, 2001; Ho; Pedersen-Bjergaard; Rasmussen, 2002).

Figura 20. Efeito da adição de metanol na recuperação de 250 ng de cada enantiômero mL^{-1} da MRT, DMR e 8-OHM. Condições de extração: 25 min; 35 °C; fibra de 6 cm; 1 mL de plasma, 4 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,5 mol L^{-1} pH 8 (fase doadora); éter n-hexílico (fase extratora); 15 μL de solução de ácido acético glacial 0,01 mol L^{-1} (fase aceptora). As condições cromatográficas são apresentadas na seção 3.1.2.2. (n=3 para cada experimento).

4.1.4.9. Diluição do plasma

A diluição das amostras de plasma é um outro 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 (Blanchard, 1981). Embora não tenha sido diretamente avaliada, a redução na viscosidade da matriz proporcionando um deslocamento satisfatório no equilíbrio fármaco-proteína foi conseguida com a adição de 3 mL da solução tampão fosfato de sódio 0,5 mol L^{-1} pH 8 em 1 mL de plasma em todas as extrações.

4.1.4.10. Adição de NaCl

O efeito *salting-out* tem sido freqüentemente usado em várias técnicas de extração para diminuir a solubilidade dos compostos na fase aquosa e para aumentar sua partição no

solvente orgânico. Com esse objetivo, em estudos preliminares, 0 a 25 % (m/v) de NaCl foi adicionado às amostras de plasma fortificadas com os compostos de interesse e então submetidas ao processo de extração. Os resultados mostraram que um aumento na força iônica de até 15% aumentou a eficiência da extração. 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 compostos, entretanto, o excesso de NaCl leva a um aumento na viscosidade do sistema, com conseqüente redução na recuperação. Nesse contexto, as amostras de plasma preparadas com 15% do sal foram selecionadas para as extrações subsequentes, uma vez que isto resultou em maiores recuperações.

4.1.4.11. Condições otimizadas de LPME em plasma humano

A máxima recuperação dos enantiômeros da MRT e de seus dois principais metabólitos empregando LPME na preparação das amostras foi alcançada alcalinizando 1 mL de plasma (previamente centrifugado) com 3 mL de uma solução tampão fosfato de sódio 0,5 mol L⁻¹ pH 8 e adicionando 15% de NaCl. Sob essas condições, os compostos de interesse foram transportados através do éter n-hexílico (solvente extrator) impregnado nos poros de uma fibra oca (obstruída em uma das extremidades) com 8,0 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 de ácido acético 0,01 mol L⁻¹ (LPME de três fases). Durante as extrações a 35° (±2) °C, as amostras foram submetidas a agitação constante em um sonificador por 45 minutos. Para cada extração uma nova fibra oca foi utilizada.

4.1.5. Validação

A validação inclui todos os procedimentos requeridos para demonstrar que um método empregado na determinação da concentração de um composto (ou compostos) presente em uma matriz 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) (Bressolle Bromet-Petit; Audran, 1996) requeridos em

estudos farmacológicos/toxicológicos, clínicos/pré-clínicos e em outras aplicações relativas à investigação e aplicação de novos fármacos (FDA, 2001).

A validação de métodos bioanalíticos segue 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 estabelecem que para os métodos cromatográficos usados em aplicações biomédicas, a validação deve contemplar principalmente os seguintes parâmetros (i) linearidade; (ii) detectabilidade; (iii) recuperação; (iv) precisão; (v) exatidão; (vi) seletividade e (vii) estabilidade (Causon, 1997).

4.1.5.1. Linearidade

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

Nos métodos cromatográficos de análise, a linearidade pode ser medida em função de uma curva analítica, semelhante à mostrada na Figura 21 para os enantiômeros da MRT, DMR e 8-OHM. 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 compostos presentes em amostras desconhecidas e definir os demais parâmetros de validação.

Figura 21. Curvas analíticas demonstrando a linearidade do método de análise dos enantiômeros da MRT, DMR e 8-OHM no intervalo de concentração plasmática de 1,25 a 125 ng de cada enantiômero mL⁻¹.

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, 1997b).

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

A partir da análise estatística de regressão linear dos mínimos quadrados foi possível afirmar que o método desenvolvido foi linear no intervalo de 1,25 a 125 ng de cada enantiômero mL⁻¹ (Figura 21), apresentando equações típicas das curvas analíticas com coeficientes de determinação (r^2) $\geq 0,98$ para todos os compostos de interesse. Esses resultados estão representados na Tabela 4.

Tabela 4. Recuperação média, linearidade e limite de quantificação dos enantiômeros da MRT, DMR, 8-OHM em plasma empregando LPME.

Fármaco/Metabólitos	Recuperação		Linearidade		LQ			
			Curva analítica	r^2	Precisão		Exatidão	
	%	CV			CV	CV ^a	Conc ^b	E ^c
(-)-(R)-MRT	45,5	1,9	0,0202x + 0,0069	0,9906	10,2	8,2	62,9	0,6
(+)-(S)-MRT	41,2	7,1	0,0199x + 0,0055	0,9891	9,9	9,0	60,4	-3,4
(+)-(S)-DMR	30,9	4,9	0,0175x - 0,0016	0,9907	8,4	6,9	59,5	-4,7
(-)-(R)-DMR	34,0	4,5	0,0184x - 0,0053	0,9987	13,5	10,7	60,2	-3,6
(-)-(R)-8-OHM	31,6	4,3	0,0113x - 0,0023	0,9949	10,2	4,7	57,4	-8,2
(+)-(S)-8-OHM	18,3	2,4	0,0093x - 0,0022	0,9952	11,7	7,7	63,1	1,0

r^2 , coeficiente de determinação; CV, coeficiente de variação para a recuperação e para a inclinação das curvas analíticas. O intervalo linear foi de 1,25-125 ng de cada enantiômero mL⁻¹.

^a CV, coeficiente de variação (expresso como porcentagem);

^b Conc, concentração analisada (expresso como ng de cada enantiômero mL⁻¹);

^c E, erro relativo (expresso como desvio dos valores teóricos);

Número de análises, n = 3 (recuperação) e n = 5 (LQ).

4.1.5.2. Limite de quantificação

O limite de quantificação é tido como a menor concentração do composto 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 composto na concentração correspondente ao limite de quantificação for pelo menos cinco vezes maior que a apresentada pela amostra de plasma humano branco;

- ❖ a resposta produzida por cada composto puder ser identificável e reprodutível com uma precisão de 20% e exatidão entre 80-120% (ou porcentagens de erro menores que 20%) (FDA, 2001).

Devido a elevada sensibilidade da técnica LC-MS-MS, foi possível quantificar os compostos dentro dos seus níveis de concentração terapeuticamente relevantes, ou seja, 1,25 ng de cada enantiômero mL^{-1} , com valores de coeficiente de variação (CV) e erro relativo inferiores a $\pm 20\%$ (Tabela 4), para todos os compostos. O LQ obtido nas amostras de plasma foi menor que aqueles descritos na literatura, exceto para os métodos descritos por Meineke *et al.* 2006 e Paus *et al.* 2004. De acordo com o primeiro método, descrito por Paus *et al.* (2004), a quantificação de todos os compostos em níveis de concentração plasmática abaixo de 0,5 ng de cada enantiômero mL^{-1} foi possível, mas empregando um equipamento alta sensibilidade e um procedimento de preparação de amostras por LLE em duas etapas. Por sua vez, Meineke *et al.* (2006) obteve valores de LQ abaixo de 1,0 ng de cada enantiômero mL^{-1} , mas apresentando um tempo acima de 50 min para a análise de todos os compostos.

4.1.5.3. Recuperação

A recuperação absoluta de um método analítico é medida comparando-se a resposta obtida para o composto adicionado e extraído de uma matriz biológica, com a 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 composto 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 relacionadas com a recuperação. Em muitos casos, baixas recuperações refletem baixas precisões (Hubert *et al.*, 1999). Mas às 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 4 mostra que empregando a LPME no pré-tratamento das amostras de plasma humano foi possível recuperar os enantiômeros da MRT com valores acima de 41%, os enantiômeros da DMR com valores acima de 30% e os enantiômeros da 8-OHM com

valores acima de 18% (CV menores que 15% para todos os compostos). Maiores recuperações têm sido descritas usando métodos tradicionais como a SPE (Meineke et al., 2006; Dodd, Burrows, Norman, 2000; Fanali et al., 2005; Mandrioli et al., 2004) e a LLE (Paus et al., 2004; de Santana, Cesarino, Bonato, 2004) para a determinação enantiosseletiva da MRT, entretanto, por se tratar de uma técnica de microextração, as recuperações obtidas no presente estudo podem ser consideradas adequados. Além disso, para a MRT, esses valores de recuperações são maiores que aqueles obtidos anteriormente pelo nosso grupo usando um procedimento de LPME no modo duas fases (de Santana, de Oliveira, Bonato, 2005). Assim, o presente método provou ser eficaz no pré-tratamento das amostras de plasma humano contendo os compostos de interesse.

4.1.5.4. *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 composto 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 (DPR) 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 composto (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 intra-ensaio com valores de CV e erro relativo menores que 15% para todos os compostos pré-tratados por LPME estão sumarizados na Tabela 5. Como mostrado na Tabela 6, os valores de precisão e exatidão interensaios para todos os compostos pré-tratados por LPME também foram inferiores a 15%.

Tabela 5. Precisão e exatidão intra-ensaio para análise dos enantiômeros da MRT, DMR, 8-OHM em plasma empregando a LPME.

Fármaco/Metabólitos	2,5 ng mL ⁻¹			50 ng mL ⁻¹			100 ng mL ⁻¹		
	Precisão		Exatidão	Precisão		Exatidão	Precisão		Exatidão
	CV ^a	Conc ^b	E ^c	CV ^a	Conc ^b	E ^c	CV ^a	Conc ^b	E ^c
(-)-(R)-MRT	1,9	2,4	-5,0	0,6	48,9	-2,3	2,6	96,7	-3,3
(+)-(S)-MRT	0,9	2,4	-5,5	4,9	48,2	-3,5	3,7	94,3	-5,6
(+)-(S)-DMR	1,8	2,5	1,5	4,7	50,1	0,3	5,0	101,4	1,4
(-)-(R)-DMR	2,5	2,4	-2,7	8,9	49,7	-0,5	3,4	101,1	1,1
(-)-(R)-8-OHM	3,7	2,5	1,2	4,7	50,4	0,8	1,5	100,8	0,8
(+)-(S)-8-OHM	5,3	2,5	-0,3	5,6	47,8	-4,3	4,4	97,2	-2,8

^a CV, coeficiente de variação (expresso como porcentagem).^b Conc, concentração analisada (expresso como ng de cada enantiômero mL⁻¹).^c E, erro relativo (expresso como desvio dos valores teóricos).

Número de análises, n= 5.

Tabela 6. Precisão e exatidão interensaios para análise dos enantiômeros da MRT, DMR, 8-OHM em plasma empregando a LPME.

Fármaco/Metabólitos	2,5 ng mL ⁻¹			50 ng mL ⁻¹			100 ng mL ⁻¹		
	Precisão		Exatidão	Precisão		Exatidão	Precisão		Exatidão
	CV ^a	Conc ^b	E ^c	CV ^a	Conc ^b	E ^c	CV ^a	Conc ^b	E ^c
(-)-(R)-MRT	10,0	2,4	-3,3	6,2	49,2	-1,6	7,2	95,8	-4,2
(+)-(S)-MRT	8,8	2,4	-4,8	8,1	50,9	1,7	5,8	93,8	-6,2
(+)-(S)-DMR	11,9	2,6	2,7	7,5	49,4	-1,2	6,9	104,9	4,9
(-)-(R)-DMR	7,4	2,5	-1,1	5,6	53,8	7,6	6,4	104,2	4,2
(-)-(R)-8-OHM	5,0	2,6	5,4	10,6	48,3	-3,4	7,6	100,2	0,2
(+)-(S)-8-OHM	3,0	2,6	5,8	10,4	47,0	-5,9	10,4	101,3	1,3

^a CV, coeficiente de variação (expresso como porcentagem).^b Conc, concentração analisada (expresso como ng de cada enantiômero mL⁻¹).^c E, erro relativo (expresso como desvio dos valores teóricos).

Número de dias, n= 3.

4.1.5.5. Seletividade (supressão de ionização)

A seletividade ou especificidade de um método analítico representa a sua capacidade em diferenciar e quantificar o composto 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, 1997b).

Como mencionado anteriormente, devido à elevada seletividade característica dos detectores de MS-MS operando no modo MRM, problemas de interferência no t_R geralmente não são muito relevantes já que para ser detectado, um composto indesejável precisa ter a

mesma razão massa/carga e formar um fragmento com a mesma razão de massa/carga daquele que está sendo monitorado. Por outro lado, efeitos de supressão de ionização são bastante comuns, particularmente quando se emprega fontes *electrospray* na presença de compostos endógenos da matriz ou fármacos co-administrados, mesmo após processos de extração convencionais (LLE e SPE).

Dessa forma, embora durante as análises das amostras de plasma não tenham sido detectados picos interferente (Figura 22), os efeitos de supressão de ionização foram avaliados pela comparação das áreas dos picos obtidos da análise de água e de amostras de plasma branco fortificadas com as soluções-padrão da *rac*-MRT e seus dois principais metabólitos e submetidos ao procedimento de extração. Além disso, a influência dos compostos endógenos também foi avaliada analisando as mudanças na resposta do MS-MS durante a análise de amostras de plasma branco no MS-MS que estava sendo constantemente alimentado, através de uma bomba de infusão, por uma solução-padrão contendo os compostos de interesse.

Figura 22. Cromatograma representativo de (A) plasma coletado antes da dosagem e (B-E) 4 horas após a administração de uma dose oral de 45 mg da *rac*-MRT. Condições cromatográficas apresentadas na seção 3.1.2.2. Todas as amostras foram pré-tratadas por LPME. (B) HAL, (C) 8-OHM, (D) MRT e (E) DMR.

Não foi observada supressão de ionização para os enantiômeros da MRT e DMR, mas os resultados obtidos para 8-OHM, bem como seus valores de recuperação (Tabela 4) sugerem alguma redução nas áreas dos picos do (+)-(S)-8-OHM após extração por LPME. Apesar disso, a quantificação dos enantiômeros do metabólito hidroxilado não foi prejudicada, uma vez que sua determinação foi realizada com base em uma curva analítica submetida ao mesmo procedimento de extração. Por fim, não foram observadas modificações no perfil de supressão de ionização quando avaliadas amostras de plasma de diferentes indivíduos.

4.1.5.6. Estudo de estabilidade

Muitos fármacos e metabólitos são relativamente instáveis e podem ser degradados em amostras biológicas durante a coleta e processamento, bem como, durante a 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, tempo e temperatura 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 dos compostos nas mesmas condições de tempo e análise (à temperatura ambiente) e após ciclos de congelamento e descongelamento.

Os resultados obtidos para os compostos nas amostras submetidas aos ciclos de congelamento e descongelamento e após 12 horas à temperatura ambiente foram comparadas com os resultados obtidos para amostras recém-preparadas empregando o teste *t*-student. (Tabela 7). Para simplificar a análise, nessa tabela somente os valores de *p* estão presentes. Como todos os valores de *p* foram superiores a 0,05, conclui-se que os ciclos de congelamento ou a manutenção da amostra a temperatura ambiente por 12 horas não provocam qualquer decomposição das amostras. 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 processamento e análise por LC-MS-MS. Outra medida tomada foi deixá-las sobre a bancada (temperatura ambiente) o menor tempo necessário para seu processamento.

Tabela 7. Estabilidade dos enantiômeros da MRT, DMR e 8-OHM em plasma após ciclos de congelamento e descongelamento e nas mesmas condições tempo e análise.

Conc. Nominal (ng mL ⁻¹)	(-)-(R)-MRT	(+)-(S)-MRT	(+)-(S)-DMR	(-)-(R)-DMR	(-)-(R)-8-OHM	(+)-(S)-8-OHM
Valores de p ^a						
<i>Ciclos de congelamento e descongelamento (n = 3)</i>						
2,5	0,6	0,6	1,0	0,2	0,4	0,5
100	0,1	0,3	0,5	0,5	0,5	0,8
<i>Condições de tempo e análise (n = 3)</i>						
2,5	0,8	0,1	0,4	1,0	1,0	0,1
100	0,4	0,3	0,7	0,2	0,2	0,4

^a Analisados pelo método do teste *t*-student com nível de significância (*p* ≤ 0,05).

4.1.6. Aplicação do método no estudo de disposição cinética

O método desenvolvido e validado foi empregado na análise de amostras de plasma coletadas de um voluntário sadio após a administração oral da *rac*-MRT (Remeron®). A (+)-(S)-MRT é preferencialmente metabolizada a 8-OHM, enquanto que o metabolismo do enantiômero (-)-(R)- ocorre preferencialmente via N+-glicuronidação, resultando em re-circulação tardia do (-)-(R)-MRT (Delbressine *et al.*, 1998) e, conseqüentemente, a forma enantiomérica (-)-(R)- do metabólito DMR é preferencialmente formada (Delbressine *et al.*, 1998; Timmer, Ad Sitsen, Delbressine, 2000; Paus *et al.*, 2004; Meineke *et al.*, 2006). Como observado na Figura 23, os resultados obtidos nos ensaios preliminares estão de acordo com os dados da literatura (Desbressine *et al.*, 1998), nos quais foram descritas elevadas concentrações da (-)-(R)-MRT.

Figura 23. Perfil concentração plasmática das formas enantioméricas MRT e DMR após administração oral de 45 mg de *rac*-MRT a um voluntário sadio.

O metabólito 8-OHM não foi encontrado nas amostras analisadas, pois tanto no plasma quanto na urina, ele encontra-se predominantemente na forma conjugada.

4.2. Análise enantiosseletiva de MRT e seus metabólitos em urina

Método LPME/CE

4.2.1. Otimização da separação quiral eletroforética

As separações enantioméricas da MRT e seus dois principais metabólitos foram otimizadas pela avaliação de vários parâmetros, incluindo seletores quirais (tipo e concentração), tampão de análise (tipo, pH e concentração do eletrólito) voltagem aplicada (kV) e temperatura do capilar. Nesses experimentos, as soluções-padrão foram preparadas em uma solução tampão fosfato de sódio 5 mmol L⁻¹, pH 5 (tampão diluído em relação ao tampão de análise para produzir o efeito *stacking* (empilhamento) e melhorar a eficiência dos picos). Como sugerido na literatura para a determinação de compostos quirais básicos (Altria, 1996), a resolução enantiosseletiva das bases fracas MRT (pka 8.10±0.20), DMR (9.00±0.20) e 8-OHM (8.50±0.20) (os valores foram obtidos usando o programa de computador *Scifinder scholar* da ACD/Labs, Toronto, ON, Canada, versão 2006) foi avaliada empregando ciclodextrinas (CDs) como seletores quirais: hidroxipropil-β-CD (HP-β-CD), β-CD sulfatada (S-β-CD) e carboximetil-β-CD (CM-β-CD) adicionadas a uma solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ (pH 2,5).

O mecanismo de reconhecimento quiral com CDs é baseado na inclusão da porção hidrofóbica da molécula, preferencialmente grupamentos aromáticos, na cavidade hidrofóbica da CD. Um pré-requisito é que interações secundárias também aconteçam; isso inclui interações dipolo-dipolo ou ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila das posições 2 e 3 da abertura da CD e os substituintes polares localizados próximo ao centro quiral do composto (Gübitz; Schmid, 1997).

Além desses, também foram realizados alguns experimentos preliminares com o sal biliar deoxicolato de sódio que mostrou capacidade mínima de resolução dos compostos de interesse nas condições empregadas.

4.2.1.1. *Influência do tipo de ciclodextrina*

Em pH 2,5, os analitos encontram-se protonados e a ionização dos grupos silanóis ácidos da superfície do capilar de sílica é pequena, então o fluxo eletrosmótico (*electrosmotic flow*, EOF) é insignificante (Altria, 1996). A HP- β -CD não ionizada e a CM- β -CD, cujos grupos carboxílicos encontram-se não carregados em pH 2,5, não migram sob essas condições e a mobilidade eletroforética é à única força responsável pela migração dos enantiômeros dos analitos de interesse do ânodo para o detector (cátodo). A mobilidade é reduzida para o enantiômero com maior interação com a CD (van Eeckhaut, Michotte, 2006). Sob essas condições, uma separação parcial foi observada usando a HP- β -CD; a CM- β -CD provou ser a mais promissora na separação de todos os compostos com valores de resolução e tempos de análise adequados. Por outro lado, a S- β -CD aniônica (negativamente carregada em toda a faixa de pH) possui mobilidade eletroforética própria e o complexo analito-seletor quiral migrou somente sob polaridade reversa. As condições empregadas não resultaram na adequada resolução do fármaco e seus metabólitos e, além disso, elevados níveis de corrente ($\approx 100 \mu\text{A}$) foram produzidos.

4.2.1.2. *Influência da concentração de ciclodextrina*

A concentração de CD normalmente afeta largamente a separação dos enantiômeros (Altria, 1996), os níveis de corrente (para CDs carregadas), o EOF e o alargamento dos picos (Bressolle, Audran, Vallon, 1996). Infelizmente, mudanças na concentração da HP- β -CD (20–40 mM) e S- β -CD (0.2-1%) não melhoraram a resolução quiral da MRT e seus dois principais metabólitos. Portanto, uma adequada separação para todos os compostos foi obtida unicamente com a CM- β -CD que foi selecionada para os experimentos posteriores. Em baixa concentração de CM- β -CD (0,1%) não há seletor quiral suficientemente disponível para formar os complexos e, portanto, a separação dos enantiômeros não foi possível para o metabólito 8-OHM. Uma adequada resolução quiral de todos os compostos foi observada empregando CM- β -CD entre 0,24-0,55% e, nesses casos, a resolução não mudou significativamente com a concentração de CD, mas a repetibilidade dos experimentos foi melhor em concentrações mais elevadas. Por outro lado, concentrações maiores que 0,55%, levaram a uma redução na mobilidade dos enantiômeros com um consequente aumento significativo do tempo de migração (Figura 24). Dessa forma 0,55% de CM- β -CD apresentou máxima capacidade de resolução quiral, com boa repetibilidade e sem prejudicar significativamente o tempo das análises e foi selecionado para os experimentos posteriores.

Figure 24. Efeito da concentração de CM-β-CD na resolução quiral de MRT, DMR, 8-OHM e LID. Condições eletroforéticas como apresentadas na seção 3.2.2.5. (A) 0,1% CM-β-CD, (B) 0,55% CM-β-CD and (C) 0,75% CM-β-CD. (1) (-)-(R)-DMR, (3) (+)-(S)-DMR, (2) (-)-(R)-MRT, (4) (+)-(S)-MRT, (5) (-)-(R)- 8-OHM, (6) (+)-(S)-8-OHM e (7) LID.

4.2.1.3. *Influência da composição do tampão de análise*

A composição do tampão de análise ou sua força iônica influencia tanto o EOF quanto o tempo de migração dos compostos. Além disso, a dispersão induzida por eletromigração pode ser reduzida aumentando a força iônica, mas isso provoca um aumento na corrente gerada (Altria, 1996). Então, a influência da força iônica do tampão de análise na enantioseparação da MRT, DMR e 8-OHM foi avaliada através de vários experimentos, sob

condições de pH e concentração do tampão de análise otimizados e usando diferentes sais na composição da solução tampão (Tris, acetato, borato e fosfato).

Uma resolução adequada com baixa corrente ($\approx 50 \mu\text{A}$) e boa repetibilidade foi obtida quando se empregou uma solução tampão fosfato de sódio. Somente uma pequena melhora na resolução dos enantiômeros do fármaco e seus dois principais metabólitos e padrão interno foi observada quando a concentração foi aumentada de 50 para 100 mmol L^{-1} , mas um aumento significativo no tempo de análise foi observado. Conseqüentemente, 50 mmol L^{-1} foi selecionado para os experimentos posteriores.

Por sua vez, o papel do pH do tampão de análise que, como mencionado anteriormente, influencia tanto o mecanismo de reconhecimento quiral quanto a mobilidade induzida pelo EOF, foi avaliado empregando soluções tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} , em diferentes pHs (2,0, 2,5, 3,5, 5,0, 7,0 e 9,0). Não foram observadas separações quando usadas soluções com valores de pH inferiores a 2,5 e, além disso, menores resoluções foram observadas em pHs acima desse valor. Dessa forma, uma solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 2,5 foi selecionado para os experimentos posteriores.

4.2.1.4. *Voltagem aplicada e efeito da temperatura de análise*

A velocidade eletroforética está relacionada com a mobilidade dos íons na solução e a magnitude da voltagem aplicada (Altria, 1996).

$$v = \mu E \cdot E$$

onde v equivale a velocidade dos íons; μE equivale a mobilidade eletroforética e E equivale a voltagem aplicada (volts/cm).

Por sua vez, a temperatura do capilar está relacionada com a viscosidade do tampão de análise que influencia diretamente a mobilidade dos compostos e com a cinética e termodinâmica do processo de inclusão-complexação com as CDs (Altria, 1996).

Dessa forma, um aumento tanto na voltagem aplicada no capilar quanto na temperatura de análise normalmente leva a uma redução nos tempos de migração e na resolução dos compostos. Entretanto, tratando-se de vários compostos e com baixos fatores de separação, pequenas alterações nesses parâmetros podem acarretar perda na eficiência da separação. Então, a temperatura de operação e a voltagem aplicada ao sistema foram otimizadas juntamente com a escolha da concentração ótima do eletrólito e as dimensões do capilar de sílica buscando uma máxima redução no tempo de análise sem perda significativa

na resolução dos enantiômeros e apresentando níveis de corrente aceitáveis. Então 25 kV de voltagem aplicada e 25 °C de temperatura foram selecionados.

4.2.2. Condições eletroforéticas otimizadas

As condições ótimas para a resolução do fármaco, seus dois principais metabólitos e o padrão interno foram obtidas usando uma solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ (pH ajustado para 2,5 com ácido fosfórico) contendo CM- β -CD 0,55 % m/v (solução tampão de análise) e voltagem constante de +25 kV a 25 °C (capilar de sílica de 80 cm (72 cm de comprimento efetivo) x 50 μ m d.i.). Sob essas condições, adequada resolução quiral (picos simétricos) foi observada para todos os analitos de interesse em 18 minutos com aceitáveis níveis de corrente (Figura 25). As amostras foram introduzidas no capilar hidrodinamicamente pela aplicação de 50 mbar de pressão positiva. O tempo de injeção de (20 seg) foi selecionado para evitar alargamento da banda e perda na resolução. Nessas condições otimizadas, foi possível resolver não só a *rac*-MRT e a *rac*-DMR, mas também a *rac*-8-OHM e o padrão interno LID em um tempo de análise inferior ao mostrado por Mandrioli *et al.* (2004) e com uma resolução equivalente.

Figura 25. Eletroferogramas representativos de (A) urina humana branca; (B) urina humana fortificada com MRT, DMR 8-OHM, na concentração de 312,5 ng de cada enantiômero mL⁻¹ e LID na concentração urinária de 1000 ng de cada enantiômero mL⁻¹; (C) amostra de urina coletada entre 8 a 12 horas após a administração oral de 45 mg de *rac*-MRT a um voluntário sadio. As condições eletroforéticas estão descritas na seção 3.2.2.5. Todas as amostras foram pré-tratadas por LPME. (1) (-)-(R)-DMR, (3) (+)-(S)-DMR, (2) (-)-(R)-MRT, (4) (+)-(S)-MRT, (5) (-)-(R)-8-OHM, (6) (+)-(S)-8-OHM e (7) LID.

Finalmente, para garantir a repetibilidade dos tempos de migração e seletividade, bem como para evitar eletrólise do tampão de análise, o reservatório do tampão de análise foi substituído após nove análises consecutivas. Do mesmo modo, os reservatórios de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ e água Milli-Q PLUS[®] também foram substituídos para evitar mudanças no condicionamento do capilar de sílica.

4.2.3. Determinação da ordem de eluição

A ordem de eluição foi definida analisando os enantiômeros opticamente puros da MRT, DMR e 8-OHM, obtidos por análise semi-preparativa usando um equipamento de HPLC-UV operando a 292 nm e sob as condições cromatográficas previamente estabelecidas na seção 3.1.2.2. Sob as condições experimentais adotadas, o isômero (-)-(R)- migrou primeiro e o isômero (+)-(S)- foi o segundo pico eluído, tanto para o fármaco quanto para seus dois principais metabólitos.

4.2.4. Reação de hidrólise

Após estabelecidas as condições de análise, o método de extração foi adaptado para a determinação dos enantiômeros da MRT, DMR e 8-OHM após a etapa de hidrólise, uma vez que esses compostos são encontrados na urina humana predominantemente na forma conjugada com agentes endógenos responsáveis pela fase tipo II do processo de metabolismo (Delbressine *et al.*, 1998). A otimização da etapa de hidrólise (ácida, básica e enzimática) foi realizada usando amostras de urina de um voluntário sadio, coletadas no intervalo de 4-8 horas após a administração de 45 mg do fármaco.

As hidrólises ácida e básica, a temperatura ambiente, foram inicialmente avaliadas e permitiram a detecção da MRT, mas não da DMR e 8-OHM. A MRT detectada nas amostras hidrolisadas a temperatura ambiente deve-se provavelmente a fração livre não metabolizada da MRT excretada na urina 4 a 8 horas após a administração do fármaco racêmico; Delbressine *et al.* demonstraram, em 1998, que pequenas quantidades de MRT não metabolizada (>1% da dose administrada) estão presente na urina 24 horas após a administração do fármaco. Embora o aquecimento das amostras de urina submetidas à hidrólise ácida (90 °C por 1 hora e 30 min) tenha favorecido a detecção de todos os compostos, observou-se também a presença de picos interferentes quando uma amostra de urina branca foi analisada, que poderiam comprometer a determinação de baixas concentrações desses compostos. Esses picos interferentes também foram observados quando se empregava a hidrólise básica.

Por outro lado, a hidrólise realizada pela adição de 100 µL da solução de β-glucuronidase e 0,5 mL de uma solução tampão fosfato 0,5 mol L⁻¹, pH 5 em 1 mL de amostra de urina, antes do procedimento de extração e a análise por CE, provou ser adequada para a

determinação dos enantiômeros da MRT e seus dois principais metabólitos, com eletroferogramas relativamente livres de interferentes e com adequada resolução e detectabilidade dos enantiômeros (Figura 25).

Durante a otimização das condições de hidrólise enzimática, a influência do tempo de hidrólise foi avaliado submetendo 1 mL de amostras de urina a aquecimento (37,5 °C) em banho Maria, em diferentes intervalos de tempo (8, 16, 18 e 22 horas) seguido de extração e análise. Como observado na Figura 26, a fração livre do fármaco e de seus dois principais metabólitos aumentou proporcionalmente com o tempo de hidrólise até 16 horas, a partir do qual começou a declinar provavelmente devido a uma desnaturação da enzima β -glicuronidase (HP-2). Dessa forma, 16 horas de incubação foi definido como o tempo de hidrólise enzimática para os estudos posteriores.

Uma solução tampão fosfato 0,5 mol L⁻¹, pH 5 foi adicionado as amostras de urina para garantir a máxima atividade das enzimas glucuronidase e sulfatase em pH ótimo (5-6, segundo recomendações do fabricante). Alíquotas de 0,5 mL dessa solução tampão adicionada foi o menor volume possível para garantir uma maior razão volumétrica durante a etapa de LPME e que permitiu um adequado tamponamento das amostras de urina humana.

Figura 26. Efeito do tempo de hidrólise na formação da fração livre do fármaco e de seus dois principais metabólitos em amostras de urina humana coletadas no intervalo de 4-8 horas após a administração de 45 mg de Remeron®, pré-tratadas por LPME. Condições de hidrólise: 1 mL de urina; 0,5 mL de tampão fosfato 0,5 mol L⁻¹, pH 5; 50 µL de enzima β -glicuronidase (HP-2); 37,5 °C. As condições eletroforéticas são apresentadas na seção 3.2.2.5. (n=3 para cada experimento).

A capacidade de hidrólise da enzima β -glicuronidase (HP-2) frente a MRT, DMR e 8-OHM em amostras de urina também foi avaliada variando o volume de solução enzimática (50 e 100 µL) e da matriz urinária (0,5 e 1 mL). Dessa forma, 50 µL de enzima foi

insuficiente para romper as ligações entre os compostos e os agentes de conjugação e 100 μL de enzima foi capaz de hidrolisar até 1 mL de urina humana (Figura 27).

Figura 27. Otimização das condições de hidrólise enzimática usando amostras de urina coletadas no intervalo de 4-8 horas após a administração de 45 mg de Remeron® a um voluntário sadio, pré-tratadas por LPME. Avaliação do volume de solução enzimática. Condições de hidrólise: 1 mL de urina; 0,5 mL de tampão fosfato 0,5 mol L⁻¹, pH 5; enzima β -glicuronidase (HP-2); 37,5 °C. As condições eletroforéticas são apresentadas na seção 3.2.2.5. (n=3 para cada experimento).

4.2.4.1. Procedimento otimizado de hidrólise enzimática

As reações de hidrólise foram realizadas empregando 100 μL da enzima β -glucuronidase contendo uma quantidade substancial de arilsulfatases e obtida a partir da *Helix pomatia* (HP-2) e 0,5 mL de uma solução tampão fosfato 0,5 mol L⁻¹ (pH 5), adicionados a 1 mL de amostras de urina humana, previamente centrifugadas durante 10 minutos a 2000 x g; as amostras foram mantidas a 37 °C sob agitação constante durante 16 horas de incubação. Ao final da hidrólise, essas amostras foram mantidas sobre a bancada até atingirem a temperatura ambiente.

Ao final da hidrólise enzimática, as amostras hidrolisadas foram submetidas ao procedimento de precipitação protéica para eliminar possível interferência da enzima no procedimento de LPME, segundo o método de precipitação protéica usado por Bortocan *et al.* (2000). Nessa etapa, 100 μL de uma solução de ácido tricloroacético 40% foi adicionado a amostra hidrolisada, que foi então agitada no *vortex* por 1 min, mantida sob repouso durante 20 min e centrifugada por 5 minutos a 1800 x g; em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de fundo cônico para posterior extração e análise. Nessas condições, o método de precipitação protéica permitiu análises com adequados valores de recuperação.

4.2.5. Otimização dos parâmetros de microextração em fase líquida

O procedimento de LPME no modo três fases utilizado para a extração da MRT, DMR e 8-OHM em amostras de urina foi baseado no método anteriormente desenvolvido para plasma (seção 4.1.4.11.). Os sobrenadantes obtidos após a precipitação protéica com ácido tricloroacético foram alcalinizadas com 1 mL de uma solução tampão fosfato 0,5 mol L⁻¹ pH 11 para obter pH da fase doadora semelhante aquele previamente empregado nas amostras de plasma. A mesma fase aceptora (ácido acético 0,001 mol L⁻¹) foi usado no interior de uma fibra oca de 8,0 cm. As extrações foram realizadas usando um equipamento de ultra-son operando a 35 (±2) °C por 45 min para aumentar a velocidade de extração por vibração da amostra. Além disso, NaCl (10%) foi adicionado a amostra de urina para reduzir a solubilidade dos analitos na amostra aquosa e aumentar sua partição no solvente orgânico (efeito *salting-out*). Usando esse sistema foi possível realizar até dez extrações simultâneas e a fase aceptora foi diretamente injetada e analisada por CE.

É fundamental mencionar que um detalhado ajuste e controle do pH das soluções foi crucial durante as análises para garantir a robustez e repetibilidade do método, uma vez que a atividade enzimática (hidrólise enzimática), os fatores de enriquecimentos e as recuperações (LPME no modo três fases) e a resolução em CE são largamente afetados por mínimas mudanças nos valores de pH.

4.2.6. Validação

Sob as condições otimizadas foram obtidas recuperações médias de 75,9 e 80,0% para os enantiômeros da MRT, de 23,4 e 23,9% para os enantiômeros da DMR e de 23,6 e 23,8% para os enantiômeros da 8-OHM, todas com valores de CV% menores que 10,6% (Tabela 8). Os valores de recuperação da MRT foram superiores aos anteriormente descritos nesse trabalho (Tabela 4) e aqueles anteriormente obtidos pelo nosso grupo (de Santana, Cesarino, Bonato, 2004; de Santana, de Oliveira, Bonato, 2005).

O método provou ser linear no intervalo de concentração urinária de 62,5-2500 ng de cada enantiômero mL⁻¹ da MRT e 8-OHM e no intervalo de concentração urinária de 62,5-1250 ng de cada enantiômero mL⁻¹ da DMR (Figura 28) com equações típicas de curvas analíticas e coeficiente de determinação (r^2) como mostrado na Tabela 8. Valores de CV%

tanto para a precisão e exatidão intra-ensaios (Tabela 9) quanto para a precisão e exatidão interensaios (Tabela 10), para todos os compostos analisados, foram menores que 15%.

Tabela 8. Recuperação média, linearidade e limite de quantificação do método analítico.

Fármaco/Metabólitos	Recuperação média		Linearidade		Limite de Quantificação			
			Curva de calibração	r ²	Precisão		Exatidão	
	%	CV			CV	CV ^a	Conc ^b	E ^c
(-)-(R)-MRT	75,9	8,9	0,0006x - 0,0284	0,9976	13,7	9,7	58,3	-6,8
(+)-(S)-MRT	80,0	4,6	0,0006x - 0,033	0,9969	15,4	13,6	58,3	-6,8
(-)-(R)-DMR	23,4	5,7	0,0004x - 0,0712	0,9893	13,5	6,9	58,0	-7,2
(+)-(S)-DMR	23,9	7,7	0,0004x - 0,0919	0,9928	14,1	5,0	59,2	-5,2
(-)-(R)-8-OHM	23,6	10,6	0,0005x - 0,0238	0,9974	13,9	10,7	58,5	-6,4
(+)-(S)-8-OHM	23,8	10,0	0,0005x - 0,0271	0,9978	14,4	11,0	56,5	-9,5

r², coeficiente de determinação; CV, coeficiente de variação para a recuperação e para a inclinação das curvas analíticas. Intervalo linear na concentração urinária de 62,5-2500 ng de cada enantiômero mL⁻¹ (MRT e 8-OHM) e 62,5-1250 ng de cada enantiômero mL⁻¹ (DMR).

- ^a CV, coeficiente de variação (expresso como porcentagem);
^b Conc, concentração analisada (expresso como ng de cada enantiômero mL⁻¹);
^c E, erro relativo (expresso como desvio dos valores teóricos);
Número de análises, n = 3 (recuperação) e n= 5 (LQ).

Figura 28. Curvas analíticas mostrando a linearidade do método de análise dos enantiômeros da MRT, DMR e 8-OHM no intervalo de concentração urinária de 62,5-2500 ng de cada enantiômero mL⁻¹ da MRT e 8-OHM e no intervalo de concentração urinária de 62,5-1250 ng de cada enantiômero mL⁻¹ da DMR. As amostras foram pré-tratadas empregando a LPME.

Como mencionado anteriormente, um total de 80 a 94% da dose administrada da *rac*-MRT é excretada, sendo que mais de 75% na urina e a parte restante nas fezes (Delbressine *et al.*, 1998). Conseqüentemente, é possível quantificar os compostos dentro dos níveis de concentração terapeuticamente relevantes (LQ = 62,5 ng de cada enantiômero mL⁻¹) para cada enantiômero com boa precisão e exatidão (Tabela 8).

Tabela 9. Precisão e exatidão intra-ensaio para a análise dos enantiômeros da MRT, DMR e 8-OHM em urina humana.

Fármaco/Metabólitos	100 ng mL ⁻¹			875/500 ng mL ⁻¹			1750/1000 ng mL ⁻¹		
	Precisão		Exatidão	Precisão		Exatidão	Precisão		Exatidão
	CV ^a	Conc ^b	E ^c	CV ^a	Conc ^b	E ^c	CV ^a	Conc ^b	E ^c
(-)-(R)-MRT	12,3	102,9	2,9	9,4	780,2	-10,8	4,7	1524,4	-12,9
(+)-(S)-MRT	14,2	110,3	10,3	11,0	792,1	-9,5	6,6	1534,5	-12,3
(-)-(R)-DMR	2,6	93,1	-6,8	5,1	584,6	9,1	7,8	972,4	-2,7
(+)-(S)-DMR	8,2	93,4	-6,6	7,9	611,0	14,2	11,5	977,4	-2,3
(-)-(R)-8-OHM	7,9	93,8	-6,2	11,3	805,3	-8,0	8,6	1554,1	-11,2
(+)-(S)-8-OHM	8,5	94,2	-5,8	9,8	768,0	-15,0	4,0	1486,4	-15,0

^a CV, coeficiente de variação (expresso como porcentagem);

^b Conc, concentração analisada (expresso como ng de cada enantiômero mL⁻¹);

^c E, erro relativo (expresso como desvio dos valores teóricos);

Número de análises, n= 5.

Tabela 10. Precisão e exatidão interensaios para a análise dos enantiômeros da MRT, DMR e 8-OHM em urina humana.

Fármaco/Metabólitos	100 ng mL ⁻¹			875/500 ng mL ⁻¹			1750/1000 ng mL ⁻¹		
	Precisão		Exatidão	Precisão		Exatidão	Precisão		Exatidão
	CV ^a	Conc ^b	E ^c	CV ^a	Conc ^b	E ^c	CV ^a	Conc ^b	E ^c
(-)-(R)-MRT	9,3	99,6	-0,3	9,4	796,4	-7,4	8,7	1583,9	-9,5
(+)-(S)-MRT	9,4	103,4	3,8	5,7	794,5	-7,2	9,0	1621,7	-7,3
(-)-(R)-DMR	7,5	94,3	-5,7	13,1	551,0	2,9	10,4	1041,1	4,1
(+)-(S)-DMR	6,9	95,9	-4,1	13,0	570,5	6,6	11,3	1061,7	6,2
(-)-(R)-8-OHM	4,7	96,1	-3,9	10,6	819,0	-5,6	9,9	1649,9	-5,7
(+)-(S)-8-OHM	7,8	93,3	-6,7	10,4	779,2	-10,1	6,8	1573,5	-10,1

^a CV, coeficiente de variação (expresso como porcentagem);

^b Conc, concentração analisada (expresso como ng de cada enantiômero mL⁻¹);

^c E, erro relativo (expresso como desvio dos valores teóricos);

Número de análises, n= 3.

Além disso, a elevada seletividade do sistema de CE e as excelentes propriedades de *clean-up* da técnica de LPME no modo três fases, bem como a inclusão de uma etapa específica de hidrólise enzimática e de uma etapa de precipitação proteica antes do procedimento de extração, garantiu amostras extremamente limpas, resultando em

eletroferogramas completamente livres de picos endógenos interferentes e permitindo a obtenção de menores limites de quantificação e adequados valores de recuperação (Figura 25).

A seletividade do método analítico também foi avaliada na presença de outros fármacos. Como observado na Tabela 11, os tempos de migração para a maioria dos fármacos analisados sob as condições eletroforéticas estabelecidas não foram similares aqueles obtidos para a MRT, seus dois principais metabólitos e padrão interno. Além disso, quando alguns fármacos analisados mostraram tempos de migração coincidentes aos compostos de interesse, eles deixaram de ser detectados após terem sido submetidos ao processo de extração.

Tabela 11. Avaliação da interferência de alguns fármacos na análise quiral da MRT, DMR, 8-OHM e LID.

Fármaco	t_m^a	Fármaco	t_m^a	Fármaco	t_m^a
MRT	8,2/9,5	Disopiramida	11,6	Lidocaina (P.I.)	13,7
DMR	7,9/8,9	Etosuximida	ND	Mexiletina	10,5
8-OHM	10,7/11,1	Fenilbutazona	ND	Mianserinaa	ND
Albendazol	ND	Fenobarbital	ND	Procainamida	8,4
Amiodarona	ND	Fenoprofen	ND	Propiofenona	ND
Amitriptilina	ND	Fenproporex	11,3	Propoxifeno	ND
Atropina	17,7	Haloperidol	ND	Propranolol	15,3/15,7
Carbamazepina	ND	Imipramina	ND	Tioridazina	ND
Clorpromazina	ND	Lercanidipina	ND	Trimetropim	10,3
Cimetidina	10,3	Levomepromazina	ND		

Condições eletroforéticas como descrito na seção 4.2.2. As análises foram realizadas empregando um capilar com 48 cm de comprimento efetivo.

ND, não detectado pelo método eletroforético até 20 min de análise.

^a t_m , tempo de migração (min).

Os testes de estabilidade não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre as amostras recém preparadas e as amostras submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento ou estocadas a temperatura ambiente por 12 horas (Tabela 12).

Tabela 12. Estabilidade dos enantiômeros da MRT, DMR e 8-OHM em urina humana após ciclos de congelamento e descongelamento e nas mesmas condições de tempo e análise.

Conc. Nominal (ng mL ⁻¹)	(-)-(R)-MRT	(+)-(S)-MRT	(-)-(R)-DMR	(+)-(S)-DMR	(-)-(R)-8-OHM	(+)-(S)-8-OHM
Valores de <i>p</i> ^a						
<i>Ciclos de congelamento e descongelamento (n = 3)</i>						
100	0,6	0,6	0,1	0,3	0,8	0,5
1750	0,8	0,8			0,9	1,0
1000			0,07	0,1		
<i>Condições de tempo e análise (n = 3)</i>						
100	0,3	1,0	0,9	0,7	0,8	0,2
1750	0,07	0,05			0,1	0,1
1000			0,3	1,0		

^a teste *t*-student, nível de significância $p \leq 0,05$.

4.2.7. Aplicação dos métodos no estudo de disposição cinética

Finalmente, o método desenvolvido e validado foi usado para a análise das amostras de urina coletadas de um voluntário sadio após a administração oral da *rac*-MRT. A quantidade excretada acumulada *versus* os intervalos de coleta para cada enantiômero da MRT e seus dois principais metabólitos foram relacionados em um gráfico. Como mostrado na Figura 29, os resultados obtidos nos ensaios preliminares estão de acordo com os dados da literatura (Desbressine *et al.*, 1998). De acordo com os esses autores, menos de 4 % da dose administrada é excretada inalterada e o enantiômero (-)-(R)- sofre re-circulação tardia. Portanto, a MRT é predominantemente excretada como (+)-(S)-8-OHM.

Figura 29. Perfil quantidade acumulada excretada das formas enantioméricas da MRT, DMR e 8-OHM após a administração oral de 45 mg de *rac*-MRT a um voluntário sadio e pré-tratadas por LPME.

4.3. Análise enantiosseletiva de MRT e seus metabólitos em urina

Método SPME

4.3.1. Otimização dos parâmetros de microextração em fase sólida

Os experimentos de SPME foram realizados usando 1 mL de amostras de urina fortificadas com 25 µL de *rac*-MRT, *rac*-DMR e *rac*-8-OHM (6250 ng de cada enantiômero mL⁻¹) e alcalinizadas com 2 mL de uma solução tampão fosfato de sódio 1 mol L⁻¹. A agitação com barra magnética (1100 rpm) foi usada para acelerar a extração. Considerando a estabilidade do recobrimento da fibra em solvente orgânico, metanol foi usado como solvente de desorção. Após estabelecidas essas condições iniciais, alguns outros fatores foram otimizados (n=2 para todos os experimentos) para obter a máxima eficiência na extração: recobrimento da fibra, temperatura de extração, tempo de extração, tempo de desorção, pH da solução aquosa, adição de NaCl e *carry-over*. A influência na extração foi estabelecida relacionando a razão de área dos picos (eixo das ordenadas) *versus* cada parâmetro avaliado (eixo das abcissas). Nesse caso, o padrão interno era adicionado após a extração.

4.3.1.1. Tipo de recobrimento da fibra

A escolha de um recobrimento específico (PDMS-DVB ou CW-TRP) depende da estrutura química dos compostos (Liu, *et al.*, 1997). Além disso, recobrimentos com espessuras maiores são preferíveis para obter baixos limites de detecção (LD) (Jinno, *et al.*, 1996). Uma maior eficiência na extração da MRT, composto menos polar ($\log D = 2,40$), foi observada usando uma fibra mista (PDMS-DVB), contendo o polímero PDMS, de carácter apolar, e o polímero DVB, de carácter mais polar. Um recobrimento mais polar (CW-TRP) resultou em maior recuperação da 8-OHM ($\log D = 2,03$), mas não da DMR ($\log D = 1,16$) (valores de $\log D$ entre n-octanol e água em pH 8 (25° C) foram obtidos usando o programa de computador *Scifinder scholar* da ACD/Labs, Toronto, ON, Canada, versão 2006). Além disso, a estabilidade do recobrimento no pH das amostras aquosas é outro fator limitante para a escolha do recobrimento da fibra. De acordo com os fabricantes, as fibras de PDMS-DVB e CW-TPR são mais duráveis que outras fibras comerciais uma vez que elas não contêm epóxi (um adesivo presente em todas as outras fibras) e PDMS-DVB é mais estável em uma ampla faixa de pH (2 a 11). Considerando esse fato, a elevada eficiência na extração da MRT e os resultados aceitáveis para a DMR e 8-OHM (Figura 30), a fibra de PDMS-DVB, com 60 μm de espessura de recobrimento, foi selecionada para os experimentos posteriores.

Figura 30. Efeito do tipo de recobrimento na recuperação de MRT, DMR e 8-OHM (6250 ng de cada enantiômero mL^{-1}) Condições de extração: 22 $^{\circ}\text{C} \pm 2$; 1 mL de urina, 2 mL de solução tampão fosfato de sódio 1 mol L^{-1} , pH 11 (fase aquosa); 30 min de extração; 100 μL de metanol (solvente de desorção); 1 min de desorção. As condições eletroforéticas são apresentadas na seção 3.2.2.5. ($n=2$ para cada experimento).

4.3.1.2. Composição da amostra

Ajustes na composição da amostra aquosa são um importante parâmetro em SPME de compostos ligeiramente ácidos e básicos, uma vez que a transferência de massas é largamente afetada pelo coeficiente de difusão dos compostos entre a amostra aquosa e o recobrimento da

fibra. Além disso, a SPME com recobrimento polimérico não iônico pode extrair somente espécies neutras (Pawliszyn, 1999). Então, o pH da amostra aquosa foi avaliado na região alcalina pela adição de soluções tampão fosfato de sódio 1 mol L⁻¹ em diferentes pHs (8, 10, 11 and 12) para manter os compostos na forma não ionizada. Como observado na Figura 31, consideráveis recuperações foram obtidas para ambos os compostos básicos MRT e DMR até pH 12, mas não para o 8-OHM, no qual foi observada uma redução na extração em pH > 11, provavelmente devido a uma diminuição na taxa de distribuição pela ionização dos grupos hidroxilas em condições de elevada basicidade. Portanto, adequada eficiência na extração para todos os compostos de interesse foi obtida usando uma solução tampão fosfato de sódio 1 mol L⁻¹ pH 11 (pH da amostra aquosa = 8), a qual foi selecionada para os experimentos posteriores.

Figura 31. Efeito do pH da amostra na recuperação da MRT, DMR e 8-OHM (6250 ng de cada enantiômero mL⁻¹) Condições de extração: 22 °C±2; 1 mL de urina, PDMS-DVB (60 µm de espessura de recobrimento); 30 min de extração; 100 µL de metanol (solvente de desorção); 1 min de desorção. As condições eletroforéticas são apresentadas na seção 3.2.2.5. (n=2 para cada experimento).

NaCl (0-30%, m/v) foi adicionado nas amostras de urina fortificadas com *rac*-MRT, *rac*-DMR e *rac*-8-OHM para avaliar o efeito *salting-out* (Boyd-Boland, Pawliszyn, 1995).

Como observado na Figura 32, a extração dos compostos diminuiu com o aumento da força iônica. Este resultado pode ser explicado devido a uma redução na capacidade de movimentação do fármaco e de seus dois principais metabólitos na amostra aquosa pelo aumento da viscosidade do sistema. Consequentemente, NaCl não foi adicionado nos experimentos posteriores.

Figura 32. Efeito da adição de NaCl na amostra na recuperação da MRT, DMR e 8-OHM (6250 ng de cada enantiômero mL⁻¹). Condições de extração: 22 °C±2; 1 mL de urina humana, 2 mL de solução tampão fosfato de sódio 1 mol L⁻¹, pH 11 (fase aquosa); PDMS-DVB; 30 min de extração; 100 µL de metanol (solvente de desorção); 1 min de desorção. As condições eletroforéticas são apresentadas na seção 3.2.2.5. (n=2 para cada experimento).

4.3.1.3. Tempo e temperatura de extração

Como mencionado anteriormente, a técnica de SPME não é um processo exaustivo, mas um processo de equilíbrio, no qual a transferência de massa dos compostos da amostra aquosa para o recobrimento polimérico da fibra aumenta com o tempo de extração até atingir o equilíbrio. Neste momento, um aumento no tempo de extração não afeta a quantidade do composto que será extraída (Lord, Pawliszyn, 2000). Quando o tempo de extração é menor que o tempo requerido para que o equilíbrio seja estabelecido, este deve ser muito bem controlado para garantir uma boa reprodutibilidade nas análises (Alpendurada, 2000). Na Figura 33, um perfil do efeito do tempo de extração de 15 a 60 min foi construído mostrando a dependência da quantidade de composto extraída em função do tempo de extração. Os resultados obtidos mostram que o equilíbrio não foi alcançado nesse intervalo de tempo. O tempo de 30 min foi selecionado para os experimentos posteriores com uma boa relação entre eficiência na extração e adequado tempo de análise.

Figura 33. Efeito do tempo de extração na recuperação da MRT, DMR e 8-OHM (6250 ng de cada enantiômero mL⁻¹) Condições de extração: 22 °C±2; 1 mL de urina, 2 mL de solução tampão fosfato de sódio 1 mol L⁻¹, pH 11 (fase aquosa); PDMS-DVB; 100 µL de metanol (solvente de desorção); 1 min de desorção. As condições eletroforéticas são apresentadas na seção 3.2.2.5. (n=2 para cada experimento).

O efeito da temperatura na extração da MRT e seus dois principais metabólitos também foi avaliada, mas não foram observadas mudanças significativas com o aumento da temperatura de 22 (±2) °C a 80 (±2) °C. Portanto, os demais experimentos foram realizados a temperatura ambiente (22 (±2) °C) (Figura 34).

Figura 34. Efeito da temperatura de extração na recuperação da MRT, DMR e 8-OHM (6250 ng de cada enantiômero mL⁻¹) Condições de extração: 1 mL de urina, 2 mL de solução tampão fosfato de sódio 1 mol L⁻¹, pH 11 (fase aquosa); PDMS-DVB; 100 µL de metanol (solvente de desorção); 30 min de extração. As condições eletroforéticas são apresentadas na seção 3.2.2.5. (n=2 para cada experimento).

4.3.1.4. Condições de desorção e carry-over

A cinética de desorção foi avaliada variando o tempo de exposição da fibra ao metanol de 1 a 7 min. Como observado na Figura 35, o aumento no período de exposição da fibra ao solvente de desorção (metanol) não resultou em variações significativas na quantidade do

composto que foi extraída, sugerindo uma completa e rápida desorção dos compostos presentes no recobrimento da fibra. Além disso, *carry-over* não foi observado e 1 min de tempo de desorção foi considerado suficiente.

Figura 35. Efeito do tempo de desorção na recuperação da MRT, DMR e 8-OHM (6250 ng de cada enantiômero mL⁻¹) Condições de extração: 22 °C±2; 1 mL de urina, 2 mL de solução tampão fosfato de sódio 1 mol L⁻¹, pH 11 (fase aquosa); PDMS-DVB; 100 µL de metanol (solvente de desorção); 30 min de extração. As condições eletroforéticas são apresentadas na seção 3.2.2.5. (n=2 para cada experimento).

4.3.1.5. Condições otimizadas de microextração em fase sólida

Considerando os experimentos discutidos acima, o procedimento de SPME foi realizado usando amostras de urina alcalinizadas (pH 8) com uma solução tampão fosfato de sódio 1 mol L⁻¹ pH 11. Os compostos foram extraídos sob agitação constante (1100 rpm) por 30 min, a temperatura ambiente (22 °C ± 2), usando fibra de PDMS-DVB e metanol como solvente de desorção (1 min).

4.3.2. Validação

Utilizando a SPME no pré-tratamento das amostras de urina humana foram obtidas recuperações médias menores que 7,0 % para os enantiômeros da MRT (6,6 e 5,4 %), DMR (1,6 e 2,2 %) e 8-OHM (3,7 e 0,7 %), com valores de CV% menores que 9,1% (Tabela 13). Apesar desses baixos valores, essas recuperações foram suficientes para quantificar os compostos dentro dos seus níveis de concentração plasmática terapeuticamente relevantes em urina humana. Além disso, recuperação semelhante da MRT foi descrita por Silva *et al.*, 2007, utilizando um sistema não quiral de SPME-LC-UV-DAD para a determinação simultânea de vários antidepressivos não tricíclicos em plasma humano. O uso de SPME e de uma técnica mais sensível (LC-MS-MS) também permitiu obter LQs semelhantes (62,5 ng mL⁻¹) aqueles

obtidos usando outra técnica de microextração (LPME) para a extração e CE para as análises enantiosseletivas (Tabela 13).

Tabela 13. Recuperação média, linearidade e limite de quantificação dos enantiômeros da MRT, DMR, 8-OHM em urina empregando SPME.

Fármaco/Metabólitos	Recuperação		Linearidade			LQ		
						Precisão		Exatidão
	%	CV	Curva analítica	r ²	CV	CV ^a	Conc ^b	E ^c
(-)-(R)-MRT	6,6	1,6	0,0014x + 0,0457	0,9986	5,4	8,2	62,9	0,6
(+)-(S)-MRT	5,4	1,9	0,0013x + 0,0498	0,9974	3,9	9,0	60,4	-3,4
(+)-(S)-DMR	1,6	7,2	0,0002x + 0,0134	0,9977	5,8	6,9	59,5	-4,7
(-)-(R)-DMR	2,2	5,6	0,0002x + 0,0241	0,9998	3,7	10,7	60,2	-3,6
(-)-(R)-8-OHM	0,37	9,1	0,0012x + 0,0468	0,9965	4,8	4,7	57,4	-8,2
(+)-(S)-8-OHM	0,35	6,2	0,0001x + 0,0286	0,9998	6,5	7,7	63,1	1,0

r², coeficiente de determinação; CV, coeficiente de variação para a recuperação e para a inclinação das curvas analíticas. O intervalo linear foi de 62,5-1250 ng de cada enantiômero mL⁻¹.

^a CV, coeficiente de variação (expresso como porcentagem);

^b Conc, concentração analisada (expresso como ng de cada enantiômero mL⁻¹);

^c E, erro relativo (expresso como desvio dos valores teóricos);

Número de análises, n = 3 (recuperação) e n = 5 (LQ).

O método provou ser linear no intervalo de concentração urinária de 62,5-2500 ng mL⁻¹ para cada enantiômero da MRT, DMR e 8-OHM, apresentando coeficientes de determinação (r²) > 0,99 (Tabela 13). Foram obtidos valores adequados de CVs e erro relativo (E) para todos os enantiômeros analisados nos estudos precisão e exatidão intra- (Tabela 14) e interensaios (Tabela 15).

Tabela 14. Precisão e exatidão intra-ensaio para análise dos enantiômeros da MRT, DMR, 8-OHM em urina empregando a SPME.

Fármaco/Metabólitos	75 ng mL ⁻¹			437,5 ng mL ⁻¹			875 ng mL ⁻¹		
	Precisão		Exatidão	Precisão		Exatidão	Precisão		Exatidão
	CV ^a	Conc ^b	E ^c	CV ^a	Conc ^b	E ^c	CV ^a	Conc ^b	E ^c
(-)-(R)-MRT	10,8	76,9	2,6	9,6	430,0	-1,7	5,6	923,3	5,5
(+)-(S)-MRT	5,7	79	5,3	7,9	447,5	2,3	2,5	965,6	10,3
(+)-(S)-DMR	8,5	73,9	-1,5	8,7	414,4	-5,3	8,2	840,8	-3,9
(-)-(R)-DMR	8,9	72,6	-3,1	6,1	444,5	1,6	10,6	897,2	2,5
(-)-(R)-8-OHM	7,0	75,6	0,8	9,0	450,0	2,9	13,4	862,9	-1,4
(+)-(S)-8-OHM	6,5	70,2	-6,4	10,9	439,2	0,4	12,9	863,4	-1,3

^a CV, coeficiente de variação (expresso como porcentagem).

^b Conc, concentração analisada (expresso como ng de cada enantiômero mL⁻¹).

^c E, erro relativo (expresso como desvio dos valores teóricos).

Número de análises, n = 5.

Tabela 15. Precisão e exatidão interensaios para análise dos enantiômeros da MRT, DMR, 8-OHM em urina empregando a SPME.

Fármaco/Metabólitos	75 ng mL ⁻¹			437,5 ng mL ⁻¹			875 ng mL ⁻¹		
	Precisão		Exatidão	Precisão		Exatidão	Precisão		Exatidão
	CV ^a	Conc ^b	E ^c	CV ^a	Conc ^b	E ^c	CV ^a	Conc ^b	E ^c
(-)-(R)-MRT	8,2	75,9	0,4	7,8	429,9	-1,7	5,6	905,2	3,4
(+)-(S)-MRT	8,0	75,3	1,2	6,4	456,8	4,4	10,3	866,6	-1,0
(+)-(S)-DMR	8,5	75,2	0,3	8,1	440,4	0,6	7,0	864,6	-1,2
(-)-(R)-DMR	5,9	76,8	2,4	4,7	451,5	3,2	8,9	853,1	-2,5
(-)-(R)-8-OHM	6,8	75,9	1,2	9,9	442,6	1,2	9,6	829,8	-5,2
(+)-(S)-8-OHM	7,1	71,6	-4,5	8,4	447,3	2,2	11	876,5	0,2

^a CV, coeficiente de variação (expresso como porcentagem).^b Conc, concentração analisada (expresso como ng de cada enantiômero mL⁻¹).^c E, erro relativo (expresso como desvio dos valores teóricos).

Número de dias, n= 3.

Amostras completamente livres de interferentes endógenos foram obtidas usando fibras de PMDS-DVB, mostrando a elevada seletividade e as excelentes propriedades de *clean-up* do procedimento de extração. Embora não tenham sido detectados picos interferentes durante as análises das amostras de urina, foi observada uma redução na intensidade do sinal do metabólito (+)-(S)-8-OHM após a extração do fármaco e seus dois principais metabólitos presentes nas amostras de urina por SPME, sugerindo efeitos de supressão de ionização induzida por componentes endógenos da urina. Entretanto, como discutido anteriormente, (seção 4.1.4.5.), esse comportamento é aceitável para o método analítico uma vez que a curva analítica é submetida às mesmas condições de extração. Além disso, não foram observadas variações na intensidade do sinal para todos os compostos mesmo usando amostras de diferentes origens.

Os testes de estabilidade não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os estudos de estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento e nas mesmas condições de tempo e análise com valores de $p \geq 0,05$ (Tabela 16).

Tabela 16. Estabilidade dos enantiômeros da MRT, DMR e 8-OHM em urina após ciclos de congelamento e descongelamento e nas mesmas condições tempo e análise.

Conc. Nominal (ng mL ⁻¹)	(-)-(R)-MRT	(+)-(S)-MRT	(+)-(S)-DMR	(-)-(R)-DMR	(-)-(R)-8-OHM	(+)-(S)-8-OHM
Valores de <i>p</i> ^a						
<i>Ciclos de congelamento e descongelamento (n = 3)</i>						
75	1,0	0,6	0,7	0,8	0,4	0,3
875	0,6	0,2	0,8	0,4	0,5	0,7
<i>Condições de tempo e análise (n = 3)</i>						
75	0,4	0,4	0,7	0,8	0,3	0,5
875	0,7	0,2	0,1	0,3	0,2	0,07

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

4.3.3. Aplicação do método no estudo de taxa de excreção urinária

Os resultados da análise das amostras de urina humana coletadas de um voluntário sadio após a administração oral da *rac*-MRT foram relacionados em um gráfico de quantidade excretada acumulada *versus* os intervalos de coleta para cada enantiômeros da MRT e seus dois principais metabólitos (Figura 36). Os resultados mostram uma elevada percentagem da dose administrada excretada como (+)-(S)-8-OHM. Além disso, (+)-(S)- e (-)-(R)-MRT também foram excretados na forma inalterada. Essas diferenças no perfil de excreção urinária acumulada dos enantiômeros da MRT e de seus metabólitos mostram que as propriedades farmacocinéticas da MRT aparentam ser enantioseletivas e estão de acordo com os dados apresentados na seção 4.1.7. para a análise dos mesmos compostos em urina humana por LPME e CE.

Figura 36. Perfil quantidade acumulada excretada das formas enantioméricas da MRT, DMR e 8-OHM após a administração oral de 45 mg *rac*-MRT a um voluntário sadio e pré-tratadas por SPME.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram apresentados e discutidos os resultados referentes à validação e aplicação de três novas metodologias para a análise enantiosseletiva da MRT e seus dois principais metabólitos em plasma e urina, empregando a LC-MS-MS e CE como técnicas analíticas e LPME e SPME como procedimentos de preparação das amostras.

Elevadas recuperações tem sido descritas usando métodos tradicionais de extração como a extração em fase sólida (Dodd, Burrows, Norman, 2000; Mandrioli *et al.*, 2004; Fanali *et al.*, 2005; Meineke, Steinmetz, Kirchheiner, Brockmoller, 2006) e extração líquido-líquido (Paus *et al.*, 2004; De Santana, Cesarino, Bonato, 2004) na determinação enantiosseletiva da MRT, entretanto as recuperações obtidas no presente estudo empregando a LPME/LC-MS-MS podem ser consideradas excelentes para procedimentos de microextração. Para a MRT, as recuperações obtidas aqui são maiores que aquelas obtidas anteriormente pelo nosso grupo usando um procedimento de LPME operando no modo duas fases (De Santana, De Oliveira, Bonato, 2005).

Destaca-se ainda que, sob as condições otimizadas, os valores de recuperação obtidos no presente estudo empregando a LPME/CE como método de análise foram ainda maiores que aqueles obtidos para o método de LPME/LC-MS-MS (de Santana, Cesarino, Bonato, 2004; de Santana, de Oliveira, Bonato, 2005) e demais métodos desenvolvidos pelo nosso grupo. Além disso, a inclusão de uma etapa de precipitação protéica antes do procedimento de extração proporcionou amostras livres de interferentes, o que resultou em limites de quantificação apropriados.

Embora a utilização da técnica de SPME na preparação das amostras de urina tenham resultado em baixas recuperações, o uso de uma técnica sensível como LC-MS-MS tornou possível quantificar os compostos de interesse dentro dos seus níveis terapêuticos de relevância.

O método de LPME operando no modo três fases e usando uma fibra oca com uma das extremidades obstruídas provou ser um procedimento de baixo custo e relativamente rápido. Além disso, obteve-se excelente eliminação dos interferentes endógenos. A SPME utilizando fibras de PMDS-DVB também provou ser uma alternativa extremamente simples e com um consumo praticamente nulo de solvente orgânico e que permitiu eletroferogramas e cromatogramas completamente livres de interferentes endógenos.

O acoplamento dessas técnicas de microextração com as técnicas de LC-MS-MS (elevada sensibilidade e seletividade) e CE (elevada seletividade e consumo mínimo de solvente orgânico) mostrou ser apropriado para a determinação dos analitos de interesse em plasma (1,25 ng de cada enantiômero mL⁻¹) e urina (62,5 ng de cada enantiômero mL⁻¹) visto que os dados no estudo de validação dos métodos estão em conformidade com os valores recomendados pela legislação vigente. Os limites de quantificação obtidos nos métodos que empregam a LPME são menores que aqueles descritos na literatura, com exceção dos métodos descritos por Meineke *et al.* e Paus *et al.* De acordo com esses autores, a quantificação da MRT e seus dois principais metabólitos poderia ser obtida em níveis de concentração abaixo de 1 ng mL⁻¹, entretanto, a maior dificuldade desses métodos são o longo tempo de análise ($\approx$ 50 min) e a complexidade do procedimento de preparação das amostras, respectivamente.

Finalmente, os métodos desenvolvidos e validados foram aplicados em um estudo piloto de disposição cinética em um voluntário sadio após administração da *rac*-MRT e sugerem um metabolismo enantiosseletivo do fármaco com predominância da forma enantiomérica (-)-(R)-MRT no plasma e (+)-(S)-8-OHM na urina humana.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-DIRBASHI, O. Y.; NAKASHIMA, K. Hyphenated chromatographic methods for biomaterials. *Biom. Chromatogr.*, Chichester, v. 14, p. 406-421, 2000.

ALPENDURADA, M. F., Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environment analysis - a review. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 889, p. 3-14, 2000.

ALTRIA, K. A. *Capillary electrophoresis guidebook. Principles, operation, and applications*. New Jersey: Human Press, 1996. 349p.

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.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers. *Anal. Chem.*, Washington, v. 62, p. 2145-2148, 1990.

BAKER, D. R. *Capillary electrophoresis*. New York: John Wiley & Sons, 1995. 244p.

BAKHTIAR, R.; RAMOS, L.; TSE, F. L. S. Use of atmospheric pressure ionization mass spectrometry in enantioselective liquid chromatography. *Chirality*, New York, v. 13, p. 63-74, 2001.

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

BONATO, P. S., Recent advances in the determination of enantiomeric drugs and their metabolites in biological fluids by capillary electrophoresis-mediated microanalysis. *Electrophoresis*, Weinheim, v. 24, p. 4078-4095, 2003.

BORTOCAN, R.; LANCHOTE, V. L.; CESARINO, E. J.; BONATO, P. S. Enantioselective analysis of disopyramide and mono-N-dealkyldisopyramide in plasma and urine by high-performance liquid chromatography on an amylose-derived chiral stationary phase. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 744, p. 299-306, 2000.

BOYD-BOLAND, A. A.; PAWLISZYN J., Solid-phase microextraction of nitrogen-containing herbicides. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 704, p. 163-172, 1995.

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.
- CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 689, p. 175-180, 1997.
- DE SANTANA, F. J. M.; CESARINO, E. J.; BONATO, P. S. New method for the chiral evaluation of mirtazapine in human plasma humano by liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 809, p. 351-356, 2004.
- DE SANTANA, F. J. M.; DE OLIVEIRA, A. R. M.; BONATO, P. S. Chiral LC determination of mirtazapine in human plasma using two-phase liquid-phase microextraction for sample preparation. *Anal. Chim Acta*, Amsterdam, v. 549, 96-103, 2005.
- 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 humano by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 748, p. 439-443, 2000.
- FANALI, S.; ATURKI, Z.; KASICKA, V.; RAGGI, M. M. A.; D'ORAZIO, G. Enantiomeric separation of mirtazapine and its metabolites by nano-liquid chromatography with UV-absorption and mass spectrometric detection. *J. Sep. Sci.*, Weinheim, v. 28, p. 1719-1728, 2005.
- 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. 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.
- GÜBITZ, G.; SCHMID, M. Chiral separation principles in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 792, p. 179-225, 1997.
- 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.
- HEMPEL, G.; Strategies to improve the sensitivity in capillary electrophoresis for the analysis of drugs in biological fluids. *Electrophoresis*, Weinheim, v. 21, p. 691-698, 2000.
- 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.

ISSAQ, H. J. Thirty-five years of capillary electrophoresis: advanced and perspectives. *J. Liq. Chrom. & Technol.*, New York, v. 25, p. 1153-1170, 2002.

JINNO, K.; MURAMATSU, T.; SAITO, Y.; KISO, Y.; MADGIC, S.; PAWLISZYN, J. Analysis of pesticides in environmental water samples by solid-phase micro-extraction-high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 754, p. 137-144, 1996.

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

KUHN, R.; HOFFSTETTER-KUNH, S. *Capillary electrophoresis: principles and practice*. New York: Springer-Verlag, p. 375, 1993.

LABAT, L.; DALLEY, 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.

LIU, Y.; LEE, M. L.; HAGEMAN, K. J.; YANG, Y.; HAWTHORNE, S. B. *Anal. Chem.* Washington, v. 69, p. 5001-5005, 1997.

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.

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.

MEINEKE, I.; STEINMETZ, H.; KIRCHHEINER, J.; BROCKMOLLER, J. Therapeutic drug monitoring of mirtazapine, desmethylmirtazapine, 8-hydroxymirtazapine, and mirtazapine-N-oxide by enantioselective HPLC with fluorescence detection. *Ther. Drug Monit.*, New York, v. 28, p. 760-765, 2006.

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.
- NIESSEN, W. M. A. State-of-art in liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 852, p. 179-197, 1999.
- OKAMOTO, Y.; YASHIDA, 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.; BUUMANN, 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.
- PAWLISZYN, J., *Application of solid-phase microextraction*, Royal Society of Chemistry, Chembridge, 1999.
- 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.; 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. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.*, Amsterdam, v. 23, p. 1-10, 2004.
- 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.

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.

SENTELLAS, S.; PUIGNOU, L.; GALCERAN, M. T. Capillary electrophoresis with on-line enrichment for the analysis of biological samples. *J. Sep. Sci.*, Weinheim, v. 25, p. 975-987, 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, 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.

SILVA, B. J. G.; QUEIROZ, R. H. C.; QUEIROZ, M. E. C. Simultaneous Determination of Nontricyclic Antidepressants in Human Plasma by Solid-Phase Microextraction and Liquid Chromatography (SPME/LC). *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v. 31, p. 313-320, 2007.

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

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

TEREBA, S.; OTSUKA, K.; NISHI, H. Separation of enantiomers by capillary electrokinetic techniques. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 666, p. 295-319, 1994.

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

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.

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

VAN EECKHAUT, A. MICHOTTE, Y. Chiral separations by capillary electrophoresis: Recent developments and applications. *Electrophoresis*, Weinheim, v. 27, p. 2880-2895, 2006.

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

ZHAI, Z. D.; SHI, Y. P.; WANG, T. Development and validation of HPLC methods for enantioseparation of mirtazapine enantiomers at analytical and semipreparative scale using

polysaccharide chiral stationary phases. *Anal. Chem Acta*, Amsterdam, v. 550, p. 123-129, 2005.

ZHU, L. Y.; 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.

7. ANEXOS

Anexo 1: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (Of30 CEP/FCFRP/10/05/05)

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Via do Café, s/nº - Fone: (16) 602-4181
Fax: (16) 633-1092
14.040-903 - Ribeirão Preto - SP - Brasil

Of30 CEP/FCFRP/10/05/05

Ribeirão Preto, 10 de maio de 2005.

Prezada Professora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado, "*Análise enantiosseletiva da mirtazapina e seus metabólicos: técnicas modernas de microextração e análise em estudo de disposição cinética*" (Protocolo CEP/FCFRP nº 48) apresentado por V.Sª foi devidamente apreciado pelo CEP, desta Faculdade, em sua 42ª reunião, realizada no dia 10 de maio p.p.e considerado **aprovado**.

Em atendimento à Resolução 196/96 deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou interrupção.

Atenciosamente,

Marlene Amaral Prado
Comitê de Ética em Pesquisa
FCFRP

Ilma. Sra.
Profª Drª Pierina Sueli Bonato
Departamento de Física e Química
FCFRP/USP