

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da microextração líquido-líquido dispersiva para
determinação do levetiracetam e da risperidona por técnicas
cromatográficas acopladas a espectrometria de massas**

Greyce Kelly Steinhorst Alcantara

Ribeirão Preto
2016

Avaliação da microextração líquido-líquido dispersiva para determinação do levetiracetam e da risperidona por técnicas cromatográficas acopladas a espectrometria de massas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para a obtenção do Título de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Greyce Kelly Steinhorst Alcantara
Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia no dia 06/06/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2016

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.

Alcantara, Greyce Kelly Steinhorst

Avaliação da microextração líquido-líquido dispersiva para determinação do levetiracetam e da risperidona por técnicas cromatográficas acopladas a espectrometria de massas. Ribeirão Preto, 2016.

115 p.:il. ; 30 cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ USP - Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: de Gaitani, Cristiane Masetto

1. OS-DLLME 2. LEV 3. RSP 4.validação 5.plasma 6. técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Greyce Kelly Steinhorst Alcantara

Avaliação da microextração líquido-líquido dispersiva para determinação do levetiracetam e da risperidona por técnicas cromatográficas acopladas a espectrometria de massas.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para a obtenção do Título de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Dedicatória

À minha amada mãe e avó, **Milda e Erna**

por todos os valores humanos ensinados, por
todo o carinho e compreensão mesmo estando
tão longe, pelos joelhos dobrados, pelo meu
exemplo de vida.

Ao meu amado irmão, **Michael**

pelo exemplo de caçula da casa, pela
responsabilidade, pelos diálogos e discussões, pelos
momentos de descontrações juntos.

Ao meu futuro marido, **Leandro**

pelo incentivo, pelos momentos de estudo, pelo
companheirismo, por todo amor concedido, pela
compreensão em todas as horas.

Agradecimentos

Agradeço a **Deus** pela proteção e pelos ensinamentos os quais me tornaram quem sou, por mostrar-me o caminho quando não o enxergava mais.

Agradeço à minha mãe **Milda**, pelo exemplo de guerreira que és, pelo seu sorriso e pelo colo insubstituível e pelas palavras de força, muitas vezes pelo telefone, as quais me ajudavam a seguir em frente.

Agradeço à minha avó **Erna**, exemplo de pessoa guerreira, pelas orações, pela compreensão mesmo estando tão longe.

Agradeço ao meu irmão **Michael**, pelos momentos divertidos em casa, pelas conversas sobre a pós-graduação, por toda a ajuda recebida.

Agradeço ao meu noivo, futuro marido, **Leandro**, pela sua disponibilidade, pelas inúmeras discussões científicas durante as viagens, pelo seu carinho, compreensão, paciência, por acreditar no meu potencial, por ser um exemplo de pessoa e profissional.

Agradeço à minha segunda “irmã”, **Caroline Marroni**, presente da USP, que esteve comigo durante todos esses anos, nos momentos de alegria e tristeza. Obrigada pelas conversas, pelas discussões, pelo apoio e pela sua compreensão.

Agradeço imensamente, à **Prof^a Dr^a Cristiane Masetto de Gaitani** por acreditar em mim desde que a procurei para ser minha orientadora, pelas discussões sobre meu projeto, pelo incentivo, por me ajudar a crescer como profissional. Também, pelos momentos de amizade, carinho, compreensão, pelas conversas, pelo abraço que me fazia andar mais um pouco.

Agradeço ao **Prof^o Dr. Jan Tytgat**, **Prof^o Dr. Wim Dehaen** e a todos do **Laboratório de Toxicologia e Farmacologia** da Universidade de Leuven, na Bélgica, pelo acolhimento em seu país, pelo apoio, pela formação científica, por todo o aprendizado.

Agradeço ao **Prof^o Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes**, **Prof^o Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira** e a **Prof^a Dr^a Regina Helena Costa Queiroz** por manter as portas sempre abertas, pela acessibilidade, pelo apoio concedido, pela contribuição científica.

Agradeço **Dra. Ana Paula Peti**, **Dr. Eduardo José Crevelin** e **Dr. Bruno Rocha** pelo auxílio nos equipamentos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas.

Agradeço aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto **Luciana Lourenço**, **Letícia Schiave**, **Lanuze Toni**, **Ivelise Gavarron**, **Mariana Demets**, **Luiz Fernando** pelo apoio, pelo companheirismo e pelas discussões científicas.

Aos meus amigos “corjenses” **Carolina Vaccari, Rafael, Juliana, Paulo, Camila, Vitor, Carolina Lorenzetto, Céli, Xico, Reinaldo, Marcela e Mário** vocês foram presentes que a pós-graduação me deu. Obrigada pelos momentos de alegria, pela companhia, pela amizade durante estes seis anos.

Aos meus amigos, **Gabriela Meireles, Fernando Anjolette, Ana Débora e Cristiane Bernardes**, agradeço todos os momentos vividos com vocês, pelos desabafos, pela amizade, pela companhia durante este tempo.

Agradeço à **Sônia Dreossi, Maria Aparecida Buzetto, Gilda Gato e Agnaldo Baldo** pelas palavras de ânimo, pela ajuda na coleta do material biológico, pela acessibilidade, pelo cafezinho, pelo sorriso no rosto, pela ajuda com os equipamentos.

Agradeço aos **professores, funcionários e alunos** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- USP, pela acessibilidade, pelo aprendizado constante, em especial aos funcionários da seção de pós-graduação: **Rosana, Rose e Henrique** pela amizade durante estes anos de pós-graduação.

Agradeço às agências de fomento **CAPES e FAPESP** (n. processo 2012/07210-8) por todo o suporte financeiro concedido para a realização deste doutorado, assim como, para a realização de parte do doutorado na Universidade de Leuven (n. processo 2014/15942-4).

Agradeço a **todos** que de alguma maneira contribuíram para meu crescimento científico e desenvolvimento deste trabalho.

*“O sucesso é a soma de pequenos
esforços repetidos dia após dia.”*

Robert Co

RESUMO

ALCANTARA, G.K.S. **Avaliação da microextração líquido-líquido dispersiva para determinação do levetiracetam e da risperidona por técnicas cromatográficas acopladas a espectrometria de massas.** 2016. 115 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A microextração líquido-líquido dispersiva baseada no uso de solventes orgânicos (OS-DLLME) vem recebendo grande destaque devido a facilidade de operação, baixo custo, rapidez e um consumo mínimo de solventes. Previamente a OS-DLLME um pré-tratamento do plasma se faz necessário a fim de propiciar a formação de uma adequada fase sedimentada. O levetiracetam (LEV) é um dos fármacos mais prescritos para o tratamento de crises epilépticas parciais e com generalizações secundárias. Assim, foi desenvolvido e validado um método bioanalítico para a quantificação do LEV em amostras de plasma por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS). O pré-tratamento das amostras de plasma empregou ultrafiltros Amicon® (poros com tamanho de 10 kDa) que formavam um permeado adequado para a realização da OS-DLLME. A adição de 130 µL de clorofórmio (solvente extrator) e 400 µL de isopropanol (solvente dispersor), sem alteração na força iônica e agitação da amostra, proporcionaram 33 % de recuperação do LEV nas amostras de plasma. Tal análise foi realizada usando uma coluna de sílica fundida recoberta com Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) empregando uma rampa de aquecimento. O tempo total de corrida cromatográfica foi de 9 minutos. O método apresentou-se linear no intervalo de concentração de 2 - 80 µg mL⁻¹ ($r \geq 0,99$), onde os resultados foram ponderados (peso = 1/x). A validade da regressão foi confirmada aplicando o teste da falta de ajuste linear. O limite inferior de quantificação (LIQ) foi de 2 µg mL⁻¹. Os parâmetros de precisão, exatidão, efeito matriz, efeito *carry-over* e estabilidade demonstraram-se em conformidade com o European Medicines Agency. Outro método foi desenvolvido e validado para a quantificação da risperidona (RSP) e seu metabólito 9-hidroxi-risperidona (9-OH-RSP) em amostras de plasma. A RSP e 9-OH-RSP correspondem a “fração ativa” do medicamento responsável pela atividade anticonvulsivante. As amostras de plasma foram pré-tratadas com ácido tricloroacético (TCA 30 %). O sobrenadante límpido foi diluído com solução de NaCl (10 %) e ajustado para o valor de pH 12, no qual foi desenvolvido a OS-DLLME. Foi adicionado um volume de 500 µL de acetona (solvente dispersor) e 80 µL de clorobenzeno (solvente extrator). Após otimização da extração, foi alcançado 89 % e 42 % de recuperação da RSP e 9-OH-RSP, respectivamente. Para tais análises foi empregada a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (LC-MS/MS). Uma coluna Ascentis® C18 (10 cm x 4,6 mm x 2,7 µm), fase móvel composta por tampão acetato de amônio e acetonitrila, em modo de eluição gradiente, vazão de 500 µL min⁻¹ e temperatura da coluna de 40 °C foram empregados. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 8 minutos. O método foi linear na faixa de concentração de 5 - 80 ng mL⁻¹ ($r \geq 0,99$), para ambos os analitos. O LIQ foi de 5 ng mL⁻¹. Todos os demais parâmetros estavam em conformidade com a agência regulatória. Ambos os métodos foram aplicados com sucesso em amostras de plasma de paciente em tratamento com LEV ou RSP. Desta forma foi possível demonstrar aplicabilidade dos métodos bioanalíticos desenvolvidos e averiguar a concentração plasmática dos devidos fármacos no paciente.

Palavras chave: OS-DLLME; LEV; RSP; validação; plasma; técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas.

ABSTRACT

ALCANTARA, G.K.S. **Evaluation of the dispersive liquid liquid microextraction for the determination of levetiracetam and risperidone by chromatographic techniques coupled mass spectrometry.** 2016. 115 f. Thesis (Doctoral). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Dispersive liquid-liquid microextraction technique based on the use of organic solvents (OS-DLLME) has received highlighted due to the easily, rapidity, low cost and low consumption of organic solvent. Prior to OS-DLLME, plasma pretreatment is necessary to provide the formation of a suitable settled phase. Levetiracetam (LEV) is one of the most prescribed drugs for the treatment-refractory partial onset seizures with or without secondary generalization. So, it was developed and validated a bioanalytical method for the quantification of LEV in plasma samples by Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS). The pretreatment of the plasma samples employed tubes of ultrafiltration Amicon® (pore size 10 kDa) in order to form a suitable permeated to carry out the OS-DLLME. The addition of 130 μL of chloroform (extraction solvent) and 400 μL of isopropanol (disperser solvent), without ionic strength and agitation of samples, have reached 33 % of recovery of LEV from plasma samples. This analysis was carried out using a fused silica coated Rtx-5MS column (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm) and a heating ramp. The run time was 9 minutes. The method was linear in the concentration range of 2 - 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r \geq 0.99$) and the results were weighted (1/x). The linear regression was confirmed by applying the lack of fit test. The lower limit of quantitation (LLOQ) was 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The precision, accuracy, matrix effect, carry-over and stability were in agreement with European Medicines Agency. Another method was developed and validated for the quantification of risperidone (RSP) and its 9-hydroxy-risperidone metabolite (9-OH-RSP) from plasma samples. The RSP and 9-OH-RSP constitutes the total active moiety responsible for the anticonvulsant activity. Plasma samples were pretreated with trichloroacetic acid (TCA 30%). The clear supernatant was diluted with NaCl solution (10%) and adjusted to pH 12, where was developed the OS-DLLME. It was added 500 μL of acetone (dispersing solvent) and 80 μL of chlorobenzene (extraction solvent). After the parameters optimization, the recovery was 89% and 42% for RSP and 9-OH-RSP, respectively. It was employed liquid chromatography-electrospray-tandem-mass spectrometry (LC/ MS/MS). Ascentis® C18 column (10 cm \times 4.6 mm \times 2.7 μM), ammonium acetate buffer and acetonitrile as mobile phase in gradient elution mode, at flow rate 500 $\mu\text{L min}^{-1}$ and column temperature of 40 $^{\circ}\text{C}$ for this analysis. The run time was 8 minutes. The method was linear in the concentration range 5 - 80 ng mL^{-1} ($r \geq 0.99$) for both analytes. The LLOQ was 5 ng mL^{-1} . All other parameters were in agreement with the regulatory agency. Both methods have been successfully applied in plasma samples from patient that receive diary doses of LEV or RSP. In this way, it was possible to present the applicability of developed bioanalytical methods and the quantitation of plasmatic concentration of these studied drugs.

Key words: OS-DLLME; LEV; RSP; validation; plasma samples; chromatographic techniques coupled mass spectrometry.

INTRODUÇÃO GERAL

Microextração Líquido-Líquido Dispersiva

1. INTRODUÇÃO

A complexidade das matrizes biológicas e a quantificação dos analitos em concentrações extremamente baixas são alguns problemas encontrados na química analítica (PAYÁN et al., 2011). Isto pode ser explicado devido ao elevado conteúdo de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, o que torna incompatível a injeção direta destas matrizes no sistema cromatográfico, uma vez que a adsorção destes componentes na fase estacionária leva à perda da eficiência da coluna e ao aumento da pressão do sistema (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010). Desta forma, é imprescindível uma etapa de preparo de amostras provenientes de matrizes complexas (plasma, soro, sangue total, homogeneizado de tecidos, saliva ou urina) (De OLIVEIRA et al., 2008) com a finalidade de isolar e pré-concentrar os analitos de interesse, eliminar os interferentes, tais como, compostos endógenos e outros fármacos administrados concomitantemente, manter os analitos em meio compatível com o instrumento de análise e atingir o limite de quantificação adequado, conforme o objetivo do estudo (QUEIROZ; LANÇAS, 2005).

No início da década de 90 houve um crescente interesse por parte da comunidade científica no desenvolvimento e no emprego de novas técnicas de preparo de amostras e procedimentos de *clean-up*, recebendo destaque as técnicas de microextração (LEE et al., 2009), com atenção especial para: i) miniaturização das técnicas de extração, ii) utilização de menores quantidades de amostras, iii) potencial de automação ou utilização de métodos “*on-line*”, iv) uso de quantidade mínima ou nenhuma de solventes orgânicos (química verde) e, v) redução nas etapas de preparo de amostras (De OLIVEIRA et al., 2008; SARAFRAZ-YAZDI; AMIRHASSAN, 2010).

Visto que a miniaturização das técnicas de preparo de amostras era o fator chave para alcançar estes objetivos (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010), Arthur e Pawliszyn (1990) despertaram o interesse dos analíticos com o desenvolvimento da microextração em fase sólida (SPME, do inglês, *Microextraction Solid-Phase*) (ARTHUR; PAWLISZN, 1990). Esta técnica baseia-se na extração de analitos de baixa e média polaridade a partir de uma fibra de sílica revestida por um material adsorvente (FARAJZADEH; KHOSHAMARAM; SHEYKHIZADEH, 2014), sendo que, o coeficiente de partição dos analitos e o material de revestimento da fibra são fatores que determinam a eficiência de extração dos analitos (REZAEI; YAMINI; FARAJI,

2010). Entretanto, a fim de superar algumas desvantagens da SPME, como a dependência de fornecedores para a concessão das fibras, efeito *carry-over*, limitações no uso de determinados solventes, entre outras (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010; SARAFRAZ-YAZDI; AMIRHASSAN, 2010), em meados da década de 90 foi desenvolvida a microextração em fase líquida (LPME, do inglês, *Microextraction Liquid-Phase*) baseada no uso mínimo de solvente orgânico (μL) (fase aceptora) para a extração de analitos provenientes de uma matriz aquosa (fase doadora) (SARAFRAZ-YAZDI; AMIRHASSAN, 2010). Assim, a LPME foi dividida em três principais categorias: i) microextração em gota suspensa (SDME, do inglês, *Single Drop Microextraction*); ii) microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês, *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) e, iii) microextração em fase-líquida com fibras ocas (HF-LPME, do inglês, *Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction*) (De OLIVEIRA et al., 2008; SARAFRAZ-YASZDI; AMIRHASSAN, 2010). Dentre estas, a DLLME é uma das técnicas que vem recebendo atenção e se destacando na área de preparo de amostras (HERRERA et al., 2010).

1.1 Princípios da DLLME

Rezaee e colaboradores (2006) desenvolveram esta nova abordagem de microextração, a qual é constituída por um sistema ternário de solventes: solvente extrator, solvente dispersor e fase aquosa (REZAEI et al., 2006). O procedimento desta técnica consiste na injeção rápida, através de uma seringa, de uma mistura de solvente extrator e dispersor, dentro da fase aquosa (contendo o analito de interesse). Esta injeção “brusca” leva à formação de um “ponto nuvem” no interior do tubo cônico (água / solvente extrator / solvente dispersor) composto por inúmeras gotículas de solvente extrator as quais estão dispersas na solução aquosa, permitindo a extração do analito em poucos segundos. Isto pode ser explicado devido à formação de uma infinita área superficial entre as gotículas de solvente extrator e as gotículas da fase aquosa, alcançando o estado de equilíbrio rapidamente. Após a centrifugação, a quantificação do analito na fase sedimentada (FS) é analisada conforme a técnica analítica mais apropriada (HU; WU; QI-FENG, 2010; REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010; SARAFRAZ-YAZDI; AMIRHASSAN, 2010; MA; LU; CHEN, 2012). As etapas da técnica encontram-se ilustradas na **figura 1.1**.

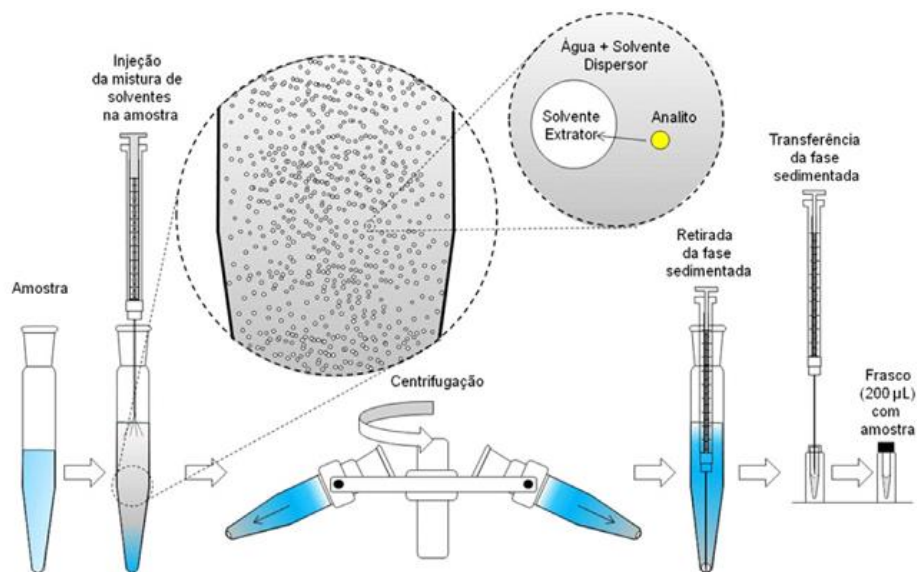


Figura I.1 Etapas do procedimento da DLLME (Martins et al., 2012).

Este procedimento ilustrado na **figura I.1** é baseado no processo de distribuição de equilíbrio do analito entre as fases aquosa e extratora (SARAJI; BOROUJENI, 2014). O coeficiente de distribuição (K) é calculado através da razão entre a concentração do analito na fase extratora e na amostra aquosa. Sendo assim, a DLLME é adequada para analitos que possuam $K > 500$, ou seja, para compostos que apresentam alta ou moderada lipofilicidade. Ainda, a técnica é adequada a compostos ionizáveis, uma vez que o coeficiente de distribuição pode ser modificado controlando-se o valor do pH da fase aquosa (ZANG, 2009).

O fator de enriquecimento (FE) e a recuperação (R) são dois parâmetros que podem expressar a eficiência de extração e são calculados conforme a **equação I.1** e **I.2**, respectivamente (REZAEI et al., 2006).

O FE é obtido pela razão entre a concentração do analito na FS (C_{sed}) e a concentração inicial do analito (C_0) em solução aquosa.

Equação I. 1

$$FE = C_{sed} / C_0$$

A recuperação da extração, calculada pela **equação I.2**, se refere a porcentagem da quantidade total de analito transferido para a fase extratora, ao final da extração.

Equação I. 2

$$R (\%) = (V_{\text{sed}} / V_{\text{aq}}) \times FE \times 100$$

Onde,

V_{sed} e V_{aq} correspondem aos volumes de FS e da amostra aquosa, respectivamente.

1.2 Parâmetros que influenciam a eficiência de extração

De acordo com CALDAS et al. (2011), a eficiência de extração dos analitos pode ser influenciada por muitos fatores, dentre eles: tipo de solvente extrator e dispersor, bem como, o volume destes, o tempo de extração, o pH da amostra e sua força iônica.

1.2.1 Tipo e volume de solvente extrator

A seleção do solvente extrator é considerada o parâmetro mais importante da técnica (MASHAYEKHI et al., 2010; REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010). Os solventes extratores devem apresentar características, tais como: i) maior densidade que a água, ii) baixa solubilidade em água, iii) compatibilidade com a técnica analítica e, iv) alta capacidade de extração dos compostos de interesse (ZANG et al., 2009; ZHAO et al., 2009). Dentre os mais empregados estão os compostos clorados (clorobenzeno, clorofórmio, tetracloreto de carbono, diclorometano e tetracloroetileno) (ZANG et al., 2009; REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010; WU et al., 2012).

Sendo assim, a DLLME baseada no uso de solventes orgânicos como solventes extratores é denominada OS-DLLME (*Organic Solvent - Dispersive Liquid Liquid Microextraction*) e difere da microextração líquido-líquido dispersiva baseada no uso de líquido iônico (IL-DLLME, do inglês, *Ionic Liquid - Dispersive Liquid Liquid Microextraction*) na qual emprega líquido iônico como solvente extrator (TIAN; CHEN; BAI, 2012).

Em relação ao volume de solvente extrator, este é selecionado em função da maior recuperação obtida e da menor quantidade de solvente clorado empregado (REZAEI et al., 2006; REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010; ZHAO et al., 2009).

1.2.2 Tipo e volume de solvente dispersor

Os solventes dispersores são selecionados baseados na sua miscibilidade entre a fase orgânica e a fase aquosa (RANJBARI et al., 2012). Dentre os mais comumente empregados estão a acetona, a acetonitrila, o metanol, o etanol e o tetraidrofurano (ANDRUCH et al., 2013; ZANG, 2009).

O volume de solvente dispersor afeta diretamente a formação do “ponto nuvem”, ou seja, o grau de dispersão do solvente extrator na solução aquosa, influenciando na eficiência de extração do analito de interesse (RANJBARI et al., 2012; REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010). Neste caso, a área superficial entre o solvente extrator e a fase aquosa (amostra) é infinitamente grande, aumentando a eficiência de extração (ZANG, 2009). Contudo, volumes menores de solvente dispersor podem ocasionar dispersão insuficiente do solvente extrator, assim como, volumes maiores podem, muito provavelmente, diminuir a solubilidade do analito pelo solvente extrator e aumentar pela fase aquosa, reduzindo a eficiência da extração (MELWANKI et al., 2009; SHAMSIPUR; FATTAHI, 2011).

1.2.3 Tempo de extração e pH

O tempo de extração é definido como o tempo entre a injeção da mistura de solventes extrator e dispersor, na fase aquosa, e a centrifugação (REZAEI et al., 2006). Como a transferência de massas é um processo tempo-dependente, os perfis da extração em relação ao tempo devem ser estabelecidos (REZAEI et al., 2008). Todavia, como a DLLME promove muito rapidamente o equilíbrio de partição do analito entre as fases aquosa e orgânica (MARTINS et al., 2012), muitos autores consideram que o tempo não é um parâmetro diferencial para a extração (REZAEI et al., 2008; SHAMSIPUR; FATTAHI, 2011; YAZDI; RAZAVI; YAZDINEJAD, 2008).

Em relação ao pH da fase aquosa este é ajustado baseado na acidez ou basicidade de cada composto, de forma que o mesmo esteja na forma não-ionizada (forma molecular) facilitando sua partição para o solvente orgânico, quando

comparado à forma ionizada do composto (CAMPONE; PICCINELLI; RASTRELLI, 2012; MASHAYEKHI et al., 2010; MELWANKI et al., 2009).

1.2.4 Força iônica

A influência da força iônica pode influenciar na eficiência de extração uma vez que a adição de sal na solução aquosa (contendo o analito) pode reduzir a solubilidade do analito na fase aquosa (MARTINS et al., 2012; ZANG et al., 2009) aumentando sua transferência para a fase orgânica (MOREIRA; YOKOYA; De GAITANI, 2014). Assim, este fenômeno pode promover o efeito *salting out* pois as moléculas de água formam esferas de hidratação ao redor dos íons de NaCl em solução aquosa diminuindo sua disponibilidade para a dissolução das moléculas do analito. Sendo assim, os analitos tendem a migrar para o solvente extrator. Entretanto, outro processo pode ocorrer concomitantemente, envolvendo moléculas mais polares, as quais podem participar das interações eletrostáticas com os íons do sal em solução, reduzindo sua habilidade de mover-se para a fase extratora e, conseqüentemente, prejudicando a eficiência de extração (MELWANKI; FUH, 2008).

1.3 Vantagens/desvantagens e aplicações da DLLME

Desde o desenvolvimento da DLLME por Rezaee et al. (2006) esta técnica de microextração vem sendo bastante utilizada pelos pesquisadores (ANDRUCH et al., 2013), refletindo no aumento do número de publicações sobre o tema (**Figura I.2**). Isto é devido à sua simplicidade de operação, rapidez, baixo custo (SARAFRAZ-YAZDI; AMIRHASSAN, 2010; ZHAO et al., 2009) e compatibilidade com diferentes técnicas analíticas (YAN; WAN, 2013).

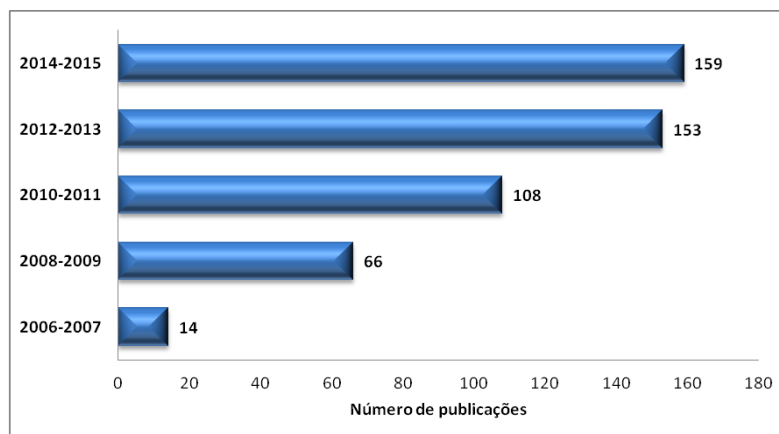


Figura I.2 Evolução do número publicações empregando a DLLME como procedimento de preparo de amostras (*Web of Science*, 2016).

No entanto, esta microextração tem sido amplamente empregada na extração de contaminantes em amostras ambientais simples, como a água, demonstrando excelente desempenho analítico na determinação de diferentes compostos (CAMPONE; PICCINELLI; RASTRELLI, 2012; ZANG et al., 2009). Por outro lado, é observada baixa aplicação da DLLME em amostras altamente complexas (ex: solo, plasma, sangue total, alimentos, entre outras) devido à falta de seletividade e, conseqüentemente, a coextração de compostos interferentes da matriz, o que vem justificar a razão de tantos trabalhos reportarem a aplicação desta técnica em matrizes simples (CAMPONE; PICCINELLI; RASTRELLI, 2012; SARAFRAZ-YAZDI; AMIRHASSAN, 2010). A **figura I.3** apresenta dados da aplicação da DLLME em diferentes amostras durante o período de 2010 - 2015.

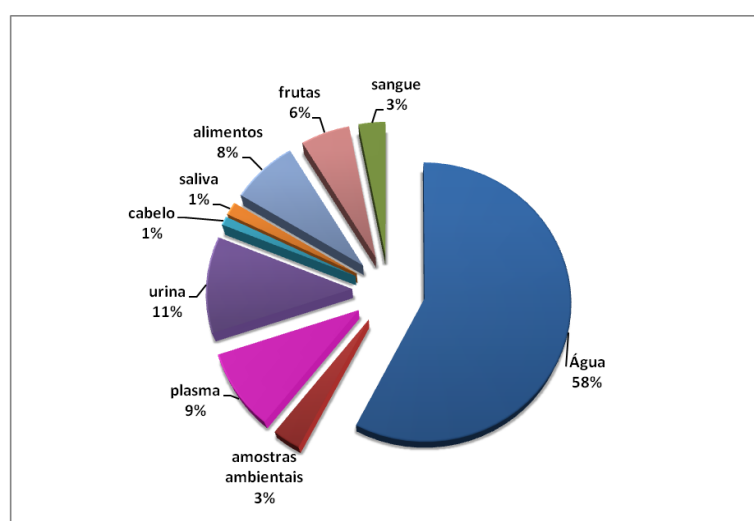


Figura I.3 Aplicação da DLLME em diferentes amostras (*Web of Science*, 2016).

A proposta em trabalhar com matrizes complexas e DLLME pode abordar diferentes estratégias para superar estas desvantagens (baixa seletividade e capacidade de *clean-up*) e obter uma FS límpida de qualquer interferente da matriz (MOREIRA; YOKOYA; De GAITANI, 2014; REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010). A mais simples delas consiste na diluição da amostra biológica reduzindo o efeito da matriz, porém procedimentos de filtração, centrifugação e precipitação também podem ser desenvolvidos. No caso de matrizes mais complexas, como o plasma, uma das maneiras mais utilizadas é a precipitação de proteínas empregando quantidade adequada de reagentes (ex: acetonitrila, metanol, acetona e ácido tricloroacético) (SARAJI; BOROUJENI, 2014). A **tabela I.1** apresenta as aplicações da DLLME em diferentes matrizes biológicas, bem como, o pré-tratamento da matriz.

Tabela I.1 Aplicação da DLLME em diferentes matrizes biológicas

<i>Análitos</i>	<i>Matriz Biológica</i>	<i>Pré-tratamento da amostra</i>	<i>Solvente extrator; volume (µL)</i>	<i>Solvente dispersor; volume (µL)</i>	<i>Técnica de análise</i>	<i>Referência</i>
7-aminoflunitrazepam	Urina	Amônia (0,2 M)	250 µL diclorometano	500 µL isopropanol	LC-ESI-MS/MS	Melwanki et al., 2009
Clozapina e clorpromazina	Urina	Centrifugação a 4000rpm/15 min	40 µL tetracloreto de carbono	200 µL etanol	HPLC-UV/Vis	Chen et al., 2011
Amitriptilina, clomipramina e tioridazina	Urina	Centrifugação a 4000 rpm/15min e filtração (0,45 µm) do sobrenadante	20 µL tetracloreto de carbono	500 µL acetonitrila	HPLC-UV/Vis	Xiong et al., 2009
Fentanil, alfentanil e sufentanil	Plasma e urina	Plasma: filtração (0,45 µm), diluição (1:4) e precipitação com metanol (1:2); Urina: filtração (0,45 µm) e diluição (1:2)	142 µL clorofórmio	2 mL metanol	HPLC-UV/Vis	Saraji et al., 2011
Carbamazepina	Plasma e urina	Plasma: precipitação com acetonitrila, centrifugação, filtração (0,45 µm) e diluição (1:10)	78 µL clorofórmio	1 mL etanol	HPLC-UV/Vis	Mashayekhi et al., 2010
Piroxicam	Urina	Urina: diluição (1:5) Centrifugação, desconjugação enzimática, incubação 6hs e centrifugação	70 µL clorofórmio	700 µL metanol	Espectrofotômetro	Tabrizi; Tutunchi, 2013

Losartam e carvedilol	Plasma e urina	Plasma: precipitação com acetona (1:1) e diluição (1:5) Urina: ajuste de pH (ácido)	Plasma: 100 µL clorofórmio Urina: 160 µL clorofórmio	Plasma: 500 µL acetona Urina: 400 µL acetona	HPLC-UV/Vis	Soltani et al., 2012
Metadona	Plasma, urina, saliva e suor	Plasma e urina: centrifugação, decantação, filtração e diluição (1:20) Saliva: centrifugação e diluição (1:100) Suor: banhos de etanol no gaze	250 µL clorofórmio	2,5 mL metanol	HPLC-UV/Vis	Ranjbari et al., 2012
Varfarina	Plasma	Precipitação com tricloroacético (10%), refrigeração (4°C/20min) e diluição	150 µL 1-octanol	150 µL metanol	HPLC-UV/Vis	Ghambari et al., 2012
Letrozol	Plasma e urina	Plasma: precipitação com acetonitrila (1:1), filtração e diluição Urina: diluição (1:5)	142 µL clorofórmio	2 mL acetona	HPLC-UV/Vis	Rezaee, Yamini, Hojjati e Faraji, 2010
morfina, codeína, papaverina, noscapina e tebaína	Urina	Centrifugação, filtração e diluição	88 µL clorofórmio	1 mL acetona	HPLC-UV/Vis	Shamsipur; Fattahi, 2011
5 fármacos antiarrítmicos	Plasma	Precipitação com acetonitrila	100 µL diclorometano	1340 µL acetonitrila	HPLC-UV/Vis	Jouyban et al., 2015
5 drogas de abuso	Plasma	Precipitação com acetonitrila	220 µL clorofórmio	3,2 mL acetonitrila	HPLC-UV/Vis	Fernández et al., 2015

Zang et al. (2009) relataram que a técnica de DLLME pode ser aprimorada a fim de ampliar a possibilidade de trabalho em diferentes matrizes, buscar alternativas de solventes extratores menos tóxicos e compatíveis com o instrumento de análise e, buscar estratégias que aumentem a taxa de transferência do analito para o solvente extrator (MOREIRA; YOKOYA; De GAITANI, 2014). Algumas estratégias já têm sido desenvolvidas para assistir a dispersão do solvente extrator na fase aquosa dentre elas, o uso do ultrassom, vórtex, micro-ondas, temperatura, dentre outras (ESCUDERO et al., 2013; GURE et al., 2015; TRUJILLO-RODRIGUÉZ et al., 2013).

CAPÍTULO I

Avaliação da microextração líquido-líquido dispersiva para a quantificação do levetiracetam por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

1. EPILEPSIA

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*, 2015) a epilepsia é a desordem neurológica mais comum no mundo, que afeta entre 2 % e 3 % da população mundial, sendo que 75 % dos casos começam antes mesmo da adolescência (PÉREZ, 2015).

A epilepsia é caracterizada pela ocorrência de crises epiléticas, as quais são definidas pela descarga anormal e excessiva das células nervosas cerebrais de uma pequena ou extensa área do cérebro, afetando temporariamente a consciência, os eventos motores, sensitivos/sensoriais, autonômicos ou psíquicos involuntários (THURMAN, et al., 2011). Pode ser causada por fatores genéticos, estruturais, metabólicos ou desconhecidos. O prognóstico do indivíduo vai depender da etiologia da doença, bem como, de um tratamento precoce e contínuo (PÉREZ, 2015).

O diagnóstico e o tratamento da epilepsia são de extrema importância, uma vez que a doença afeta a qualidade de vida dos pacientes (LINN et al, 2009) devido às crises epiléticas e os problemas psicossociais e psiquiátricos (PERSENIUS et al., 2015). De fato, almeja-se um completo controle das crises epiléticas sem originar efeitos adversos significativos, redução das taxas de morbidade (ansiedade, depressão e aflição psicológica), de mortalidade e maiores índices na qualidade de vida destes pacientes (PERSENIUS et al., 2015; LINN et al., 2009).

Até as últimas décadas do século XX os antiepiléticos de primeira geração (ex: fenobarbital, fenitoína, ácido valpróico, primidona, carbamazepina, etossuximida) eram as opções farmacológicas disponíveis para o tratamento da epilepsia (LINN et al., 2009). Entretanto, tais opções possibilitavam o controle das crises em apenas 50 % dos pacientes com crises parciais e, de 60 - 70 % naqueles que apresentavam crises generalizadas, além de apresentarem uma estreita margem terapêutica e uma pronunciada variabilidade interindividual, sendo candidatos à monitorização farmacoterapêutica e à individualização da posologia a fim de minimizar a ocorrência de efeitos adversos (La ROCHE; HELMERS, 2004; JOHANNESSEN; TOMSON, 2006; PERSENIUS et al., 2015).

Ante às novas descobertas sobre a doença e na busca de novos fármacos que pudessem controlar as crises epiléticas em pacientes refratários aos antiepiléticos clássicos, no início da década de 90 foram desenvolvidos novos

fármacos antiepilépticos ou de segunda geração (ex: topiramato, levetiracetam, gabapentina, vigabatrina, felbamato, oxcarbazepina, zonisamida e tiagabina) proporcionando com isto, novas opções farmacológicas para o controle das crises parciais e generalizadas, além de trazerem novas perspectivas para os pacientes com epilepsia (La ROCHE; HELMERS, 2004).

1.1 Levetiracetam

O levetiracetam (LEV; **Figura 1.1**) é o princípio ativo do antiepiléptico de segunda geração que é comercializado como Keppra® (UCB pharma, Bruxelas, Bélgica) (GUO et al., 2007). Ele foi aprovado para comercialização em novembro de 1999 pela *Food and Drug Administration* (FDA) (GUO et al., 2007; La ROCHE; HELMERS, 2004) e, um ano após, pela *European Medicines Evaluation Agency* (EMA), tornando-se rapidamente um dos fármacos mais prescritos para o tratamento de crises epilépticas parciais e com generalizações secundárias (DESPHANDE; DeLORENZO, 2014; GUO et al., 2007). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou em 10 de agosto de 2015, em Diário Oficial, o registro do LEV (Keppra®) para o tratamento da epilepsia, constando sua inclusão na lista C1 de medicamentos (Lista das outras substâncias sujeitas a controle especial) (RDC nº 44 de 24 de setembro de 2014) (ANVISA, 2014).

Atualmente o LEV vem sendo indicado como monoterapia no tratamento de crises parciais refratárias com ou sem generalizações secundárias para pacientes acima de 16 anos de idade ou recém-diagnosticados com epilepsia (EMA, 2011; La ROCHE; HELMERS, 2004). Também para o tratamento de crises mioclônicas em pacientes acima de 12 anos de idade que apresentam epilepsia mioclônica juvenil, para crises tônico-clônica generalizada primária em pacientes acima de 12 anos com epilepsia generalizada idiopática. Além disso, no tratamento de distúrbios bipolares, mania e enxaqueca, como monoterapia ou em combinação com outro fármaco (BARRUETO et al., 2002; EMA, 2011; PUCCI et al., 2004).

O Keppra® encontra-se comercialmente disponível nas seguintes apresentações: comprimidos revestidos nas doses de 250, 500, 750 e 1000 mg; comprimidos revestidos *extend release* (Keppra®XR) nas doses de 500 mg e 750 mg; solução oral de 100 mg/mL e formulação para administração intravenosa de 100 mg/mL.

O LEV é um derivado pirrolidínico, análogo etil do fármaco nootrópico piracetam cuja eficácia encontra-se comprovada no tratamento de mioclonias (RIZZUTTI et al., 1999; ROSSO et al., 2011). Sua atividade farmacológica é restrita ao isômero S ((S)- α -etil-2-oxo-1-pirrolidina acetamida), uma vez que, estudos *in vivo* de epilepsia demonstraram que o enantiômero R ((R)- α -etil-2-oxo-1-pirrolidina acetamida) não apresenta atividade anticonvulsivante (ISOHERRANEN et al., 2000; FRENCH; TONNER, 2009). Benedetti et al. (2003) relataram não haver conversão quiral do LEV e do seu metabólito *in vivo*, demonstrando eficácia e segurança clínica ao paciente.

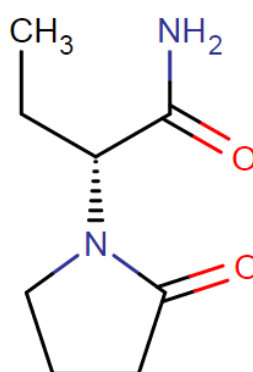


Figura 1.1 Fórmula estrutural do LEV, (S)- α -etil-2-oxo-1-pirrolidina acetamida (Chemicalize, 2016)

Tendo em vista um desejável comportamento farmacocinético, o LEV tem se destacado na área clínica (PATSALOS, 2000; BLONK et al., 2010). Logo após sua administração, sua biodisponibilidade é próxima a 100 % no local de ação, não havendo interferência pela alimentação (WEIJENBERG; BROWER; CALLENBACH, 2015). A ligação às proteínas plasmáticas é considerada insignificante (< 10 % de ligação), prevalecendo o fármaco na sua “fração ativa” disponível para exercer a ação farmacológica (LEPPIK, 2001; RADTKE, 2001; JUENKE et al., 2006). Independentemente da dose, sua absorção atinge concentração plasmática máxima (C_{max}) em aproximadamente 1 hora (PATSALOS, 2000), apresentando tempo de meia-vida de 6 a 8 horas e estado de equilíbrio 48 horas após sua administração (MAY; RAMBECK; JÜRGENS, 2003; BENEDETTI et al., 2003). Apresenta comportamento cinético linear, ou seja, a concentração plasmática do fármaco é proporcional ao aumento da dose (PATSALOS, 2000). Sua metabolização não envolve a atividade das enzimas hepáticas do sistema citocromo P450 e não afeta a indução de outros sistemas enzimáticos (PATSALOS, 2000; JUENKE et al., 2006;

MENDU; SOLDIN, 2010; FREITAS-LIMA et al., 2011), mesmo em altas doses (PUCCI et al., 2004). A principal via metabólica (24 % da dose) envolve a hidrólise no grupo acetamida da molécula gerando o metabólito ácido ucb L057, farmacologicamente inativo. Como consequência da falta de metabolização hepática, não há interações significantes do LEV com os demais antiepilépticos, contraceptivos, digoxina, varfarina, probenecida, entre outros (La ROCHE; HELMERS, 2009; WEIJENBERG; BROWER; CALLENBACH, 2015). Após 24 horas de sua administração, 66 % da dose é liberada na forma inalterada pela principal via de eliminação, a renal e, 24 % da dose é eliminada como seu metabólito ucb L057 (FRENCH; TONNER, 2009; MENDU; SOLDIN, 2010).

Estudos clínicos relataram alguns efeitos adversos comuns, tais como: dor de cabeça, astenia, tontura, infecção e sonolência, após a quarta semana de tratamento com o LEV (RIZZUTTI et al., 1999; SWAROOP et al., 2013). Entretanto, quando comparado aos outros antiepilépticos, estudos pré-clínicos mostraram alta margem de segurança do LEV, caracterizada pela considerável diferença entre a dose necessária para inibir as crises epilépticas e para ocasionar o efeito adverso ao paciente (KLITGAARD et al., 1998).

De acordo com o artigo publicado pelo Subcomitê pertencente à Liga Internacional Contra a Epilepsia, a faixa de concentração plasmática do LEV corresponde de 12 - 46 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todavia, pode ocorrer variabilidade interindividual na concentração do fármaco sendo observadas concentrações fora desta faixa terapêutica (PATSALOS, 2008). French et al. (2009) relataram que existem razões para que a concentração do LEV seja mensurada, situações especiais como, gravidez, puerpério (PATSALOS et al., 2008), população idosa e pediátrica (FRENCH; EDRICH; CRAMER, 2001; FRENCH; TONNER, 2009) e com danos renal e hepático (JOHANNESSEN et al., 2006).

Embora seu mecanismo de ação necessite de mais pesquisas, estudos em ratos demonstraram o envolvimento do LEV com a proteína SV2A, localizada na membrana das vesículas sinápticas. Esta proteína interage com a sinaptogamina, uma proteína pré-sináptica que age como sensor de Ca^{+2} no processo de exocitose e na liberação de neurotransmissores. O Ca^{+2} , maior segundo mensageiro, apresenta um grande papel na excitabilidade neuronal e plasticidade sináptica e, distúrbios no seu balanço homeostático (elevado nível de Ca^{+2} intracelular) encontra-se reportado em inúmeras desordens neurológicas (DESPHANDE; De LORENZO,

2014). Portanto, quando o LEV atua como um ligante na proteína SV2A, promove a estabilização da atividade elétrica no cérebro e, conseqüentemente, previne possíveis ocorrências de crises epilépticas (FRENCH; TONNER, 2009; WEIJENBERG; BROWER; CALLENBACH, 2015).

O LEV possui fórmula molecular $C_8H_{14}N_2O_2$ e massa molar de 170,21 g/mol. Possui alta solubilidade em água (104,0 g/100 mL), clorofórmio (65,3 g/100 mL) e metanol (53,6 g/100 mL) (ISOHERRANEN et al., 2000). É considerado solúvel em etanol (16,5 g/100 mL), moderadamente solúvel em acetonitrila (5,7 g/100 mL) e, praticamente insolúvel em hexano (PATSALOS, 2000).

A literatura descreve alguns métodos para a determinação do LEV em fluidos biológicos empregando a cromatografia gasosa com detecção por nitrogênio/fósforo (VERMEJI; EDELBROEK, 1994; GREINER-SOSANKO et al., 2007), a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta-visível (RATNARAJ et al., 1996; JUENKE et al., 2006; VERMEJI; EDELBROEK, 2007; CONTIN et al., 2008; VALARMATHY et al., 2008; GANESAN et al., 2010; ZUFÍA et al., 2010), a eletroforese capilar (SHIHABI; OLES; HINSDALE, 2003; MANGELINGS; SAEVELS; VANDER; HEYDEN, 2006) e a cromatografia líquida e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (ISOHERRANEN et al., 2000; JAIN et al., 2006; GUO et al., 2007; MATAR, 2008; BOK KIM et al., 2011).

No entanto, a técnica considerada *standard gold* para a quantificação de fármacos, metabólitos e moléculas endógenas em matrizes biológicas (sangue, saliva, soro, urina, amostras biológicas *in vitro*) (KANG et al., 2011) é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS, do inglês, *Liquid Chromatography/ Tandem Mass Spectrometry*). Características inerentes a esta técnica (sensibilidade e seletividade) aumentaram sua aplicabilidade às análises químicas e aos estudos clínicos, quando comparado aos métodos bioanalíticos desenvolvidos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês, *High-Performance Liquid Chromatography*) com detecção convencional, como o ultravioleta visível (UV-Vis) (JEMAL, 2000; MATAR, 2008).

Quanto aos procedimentos de preparo de amostras, os convencionais, baseado na extração líquido-líquido (RATNARAJ et al., 1996; GREINER-SOSANKO et al., 2007; GANESAN et al., 2010) e na extração em fase sólida (VERMEJI; EDELBROEK, 1994; ISOHERRANEN et al., 2000; PUCCI et al., 2004; VERMEJI; EDELBROEK, 2007; MATAR, 2008; ZUFÍA et al., 2010) são os mais descritos pela

literatura para análise do LEV em material biológico. A precipitação proteica, apesar de não ser considerada uma técnica eficiente de *clean-up*, também tem sido desenvolvida em diferentes trabalhos para a determinação do LEV em fluidos biológicos (SHIHABI; OLES; HINSDALE, 2003; PUCCI et al., 2004; MARTENS-LOBENHOFFER; BODE, 2005; JAIN et al., 2006; CONTIN et al., 2008; VALARMATHY et al., 2008; BOK KIM et al., 2011).

Portanto, até o momento não há relatos na literatura apresentando um método bioanalítico que utilize da OS-DLLME para a quantificação do LEV em plasma humano por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS, do inglês, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*).

CAPÍTULO II

Avaliação da microextração líquido-líquido dispersiva para a quantificação da risperidona e da 9-hidroxi-risperidona por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas tandem

1. ESQUIZOFRENIA

A esquizofrenia é uma das mais complexas desordens psiquiátricas que afetam 1,5 % da população mundial (FONSECA et al., 2013). É caracterizada pela fragmentação da estrutura básica dos processos de pensamento e pela dificuldade em distinguir as experiências internas e externas (KAPLAN; SADOCK; GREBB, 2007). O impacto desta doença provoca perdas funcionais, relacionadas a habilidades de trabalho, afetivas e de relacionamento social, interferindo na qualidade de vida do paciente, assim como de seus familiares (SANTANA; CHIANCA; CARDOSO, 2009).

Para o diagnóstico da esquizofrenia, Johann (2006) considera necessário a manifestação de pelo menos dois sintomas psicóticos, durante no mínimo um mês e, proeminentes, por pelo menos seis meses. Os sintomas se dividem em três categorias: i) sintomas positivos (delírios ou pensamentos irreais), ii) sintomas negativos (perda ou diminuição da capacidade mental, estado deficitário da motivação, das emoções, do discurso, do pensamento e das relações interpessoais) e, iii) sintomas desorganizados (afeto inapropriado, desorganização do pensamento e comportamento bizarro) (ADAD; CASTRO; MATTOS, 2000).

Sua manifestação apresenta ser mais precoce em homens (18 - 25 anos) do que em mulheres (25 - 35 anos), sendo que, na adolescência, a relação homem: mulher é de 2:1, porém acima dos 50 anos, esta proporção inverte (CHAVES, 2000). O desenvolvimento da doença pode estar relacionado a inúmeros fatores, dentre eles, biológicos, ambientais, sociais e genéticos (BUENO et al., 2013). Este último apresenta um índice de prevalência de 10 %, em parentes de primeiro grau e, quando gêmeo monozigótico este índice aumenta para 44 %, demonstrando ser o maior fator de risco isolado para o desenvolvimento da doença (NETO; BRESSAN; FILHO, 2007).

Apesar de inúmeros achados científicos terem comprovado uma disfunção dopaminérgica com a esquizofrenia, algumas evidências tem sugerido o envolvimento de receptores glutamatérgicos tipo *N-Metil-D-aspartato* (NMDA) na fisiopatologia da esquizofrenia, constituindo novos alvos para o tratamento psicofarmacológico (BRESSAN; PILOWSKY, 2003).

No início da década de 1950, os antipsicóticos típicos (clorpromazina, haloperidol, levomepromazina, primozida, dentre outros), também conhecidos como

neurolépticos, foram introduzidos na prática clínica. Entretanto, os antipsicóticos típicos controlam apenas os sintomas positivos da doença, porém promovem a indução de efeitos extrapiramidais, característica marcante do seu uso.

Contudo, o advento de antipsicóticos com um perfil “atípico” proporcionou ação farmacológica sobre os sintomas negativos da doença e o não aparecimento de efeitos extrapiramidais, quando administrados na dose terapêutica. Classificam-se como antipsicóticos atípicos a risperidona, a clozapina, a aripiprazole, a olanzapina, a quetiapina, a ziprazidona, dentre outros (MOREIRA; GUIMARÃES, 2007; OLIVEIRA, 2000).

1.1 Risperidona

A risperidona (RSP, **figura 2.1a**) é um dos fármacos antipsicóticos mais prescritos no mundo (MANDRIOLI et al., 2011), sendo indicada principalmente para o tratamento da esquizofrenia (FONSECA et al., 2013). Também foi aprovada para o tratamento das desordens maníaco-depressivas, crises bipolares com presença de sintomas psicóticos e para desordens obsessivo-compulsivas quando associada a um fármaco seletivo na inibição da receptação serotoninérgica (MANDRIOLI et al., 2011).

A RSP compõe a classe dos antipsicóticos atípicos, e diferentemente dos típicos, ou de primeira geração, seu mecanismo de ação age antagonizando seletivamente os receptores dopaminérgicos tipo D₂, D₃ e D₄ e os receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{2a} e 5-HT₇ (FONSECA et al., 2013; MAURI et al., 2007). Desta forma, promove efeito terapêutico diferente dos demais antipsicóticos típicos, pois controla de forma efetiva os sintomas positivos e negativos da psicose, assim como reduz a incidência de efeitos adversos extrapiramidais (LLERENA et al., 2003). O principal efeito extrapiramidal associado ao uso da RSP é a hiperprolactinemia, que está diretamente relacionado à dose da mesma (MANDRIOLI et al., 2011).

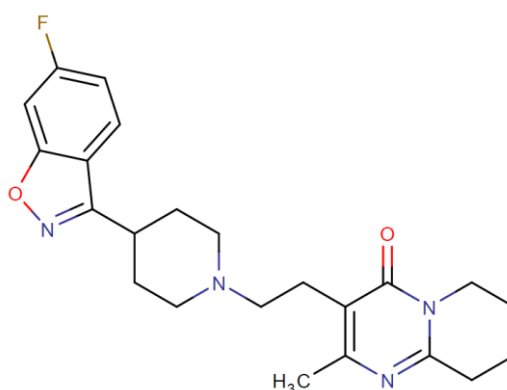
Geralmente doses orais de 2 - 6 mg diariamente são empregadas no tratamento de esquizofrenia crônica (ZHANG; TERRY; BARTLETT, 2007). Após a administração da RSP, a mesma é rapidamente absorvida, atingindo concentração plasmática máxima (C_{max}) em torno de 1 hora, biodisponibilidade oral em torno de 70 - 85 % e um estado de equilíbrio após 5 dias de tratamento. A taxa de ligação da

RSP e da 9-OH-RSP às proteínas plasmáticas, correspondem a 89 % e 77 %, respectivamente.

A metabolização ocorre principalmente no fígado pelas enzimas do citocromo P450 (CYP), isoforma CYP2D6 e, em menor extensão pela CYP3A4 (MAURI et al., 2007). Estas isoformas são responsáveis pela hidroxilação da RSP, formando os metabólitos 9-hidroxi-risperidona (9-OH-RSP) (**Figura 2.1b**) e 7-hidroxi-risperidona (7-OH-RSP) (MANDRIOLI et al., 2011). A 9-OH-RSP, também denominada de paliperidona é o principal metabólito produzido e apresenta atividade farmacológica similar à RSP. Por esta razão, a “fração ativa” representa a soma das concentrações terapêuticas da RSP e 9-OH-RSP (LLERENA et al., 2003; LEON; WYNN; SANDSON, 2010; RAGGI et al., 2005). Na literatura a concentração plasmática para ambos compostos, contemplam uma faixa terapêutica de 20 - 60 ng mL⁻¹ (RAGGI et al., 2005).

Entretanto, influências genéticas envolvendo a isoforma CYP2D6 exercem um papel importante na variabilidade dos parâmetros farmacocinéticos (MAURI et al., 2007), sendo que, o tempo de meia-vida da RSP aumenta de 3 horas para 22 horas em indivíduos que apresentem danos neste sistema de metabolização, enquanto que a 9-OH-RSP apresenta tempo de meia-vida em torno de 22 horas, independentemente de haver ou não prejuízos hepáticos (MAURI et al., 2007). A eliminação da RSP e 9-OH-RSP é predominantemente pela via renal (CABOVSKA; COX; VINKS, 2007; MAURI et al., 2007).

a)



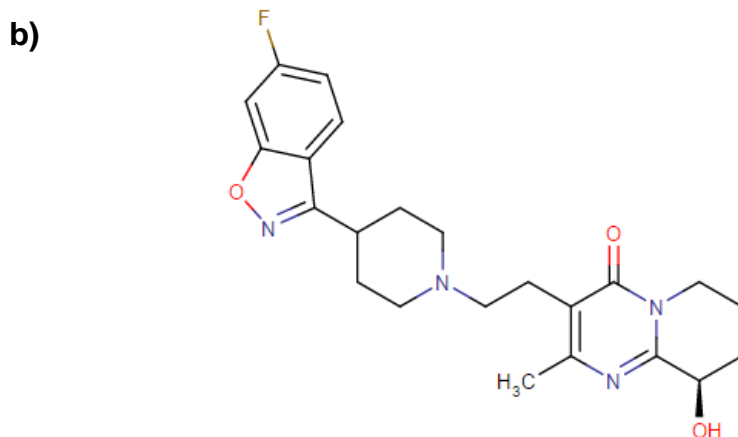


Figura 2.1 Estruturas químicas da **(a)** RSP e **(b)** 9-OH-RSP (Chemicalize, 2016)

Aravagiri e colaboradores (2003) demonstraram grande variação intra e interindividual na concentração plasmática da RSP e da 9-OH-RSP em pacientes esquizofrênicos que recebiam doses orais de RSP. Acredita-se que estas variações foram influenciadas por fatores tais como idade, danos hepáticos e renais, interações metabólicas com fármacos coadministrados e variações genéticas nas isoformas do sistema de metabolização (ARAVAGIRI et al., 2003). Assim, a monitorização terapêutica dos antipsicóticos é considerada de extrema importância, para a otimização da terapia, individualização da dose, redução do número de hospitalizações e de efeitos adversos ao paciente (MANDRIOLI et al., 2011). Além disso, uma vez que o metabólito 9-OH-RSP é capaz de contribuir na ação farmacológica juntamente com a RSP, mensurar apenas a concentração desta pode levar a interpretações errôneas nos estudos de monitoramento plasmático (MAURI et al., 2007).

A literatura descreve alguns métodos analíticos desenvolvidos para a determinação da RSP e 9-OH-RSP em fluidos biológicos, empregando principalmente a HPLC com detecção UV-VIS (AVENOSO et al., 2000; LLERENA et al., 2003; MANDRIOLI et al., 2011; RAGGI et al., 2005), acoplada à espectrometria de massas sequencial (ARAVAGIRI; MARDER, 2000; BOONLEANG et al., 2014; FONSECA et al., 2013; HUANG et al., 2008; MEULDER et al., 2008) e com detecção eletroquímica (ARAVAGIRI et al., 1998). Como técnica de preparo de amostras, grande parte dos métodos desenvolvidos empregaram a LLE (ARAVAGIRI; MARDER, 2000; BOONLEANG et al., 2014; CAI et al., 2011; HUANG et al., 2008) e a SPE (REMMERIE et al., 2003). Porém o emprego de técnicas de

microextração para a quantificação da RSP e 9-OH-RSP em plasma, encontra-se a HF-LPME (CHARMAHALI et al., 2015) e a microextração em sorvente empacotado (MEPS, do inglês, *Microextraction by Packed Sorbent*) (FONSECA et al., 2013; GONÇALVES et al., 2015; MANDRIOLI et al., 2011).

REFERÊNCIAS

ADAD, M., DE CASTRO, R., MATTOS, P. Aspectos neuropsicológicos da esquizofrenia. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22, Supl I, p. 31- 34, 2000.

ALMEIDA, A.M., CASTEL-BRANCO, M.M., FALCAO, A.C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B**, vol. 774, p. 215–222, 2002.

ANDRUCH, V., BURDEL, M., KOCÚROVÁ, L., ŠANDREJOVÁ, J., BALOGH, I.S. Application of ultrasonic irradiation and vortex agitation in solvent microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 49, p. 1–19, 2013.

ARAVAGIRI M, YUWILER A, MARDER S.R. Distribution after repeated oral administration of different dose levels of risperidone and 9-hydroxy-risperidone in the brain and other tissues of rat. **Psychopharmacology**, v. 139, p. 356-363, 1998.

ARAVAGIRI, M., MARDER, S.R. Simultaneous determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in plasma by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 35, p. 718–724, 2000.

ARAVAGIRI, M., MARDER, S.R., NUCHESTERLEIN, K.H., GITLIN, M. J. Intra- and Interindividual Variations in Steady-State Plasma Concentrations of Risperidone and 9-Hydroxyrisperidone in Schizophrenic Patients Treated Chronically with Various Doses of Risperidone. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 25, n. 6, 2003.

ARTHUR, C.L., PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, vol. 62, n. 19, pp. 2145–2148, 1990.

AVENOSO, A., FACCIOLÁ, G., SALEMI, M., SPINA, E. Determination of risperidone and its major metabolite 9-hydroxyrisperidone in human plasma by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of chromatography B**, v. 746, pp. 173-181, 2000.

BARRUETO, F.J.; WILLIAMS, K.; HOWLAND, M.A.; HOFFMAN, R.S.; NELSON, L.S. A Case of Levetiracetam (Keppra®) Poisoning with Clinical and Toxicokinetic Data. **Journal of Toxicology Clinical Toxicology**, vol. 40, n. 7, p. 881–884, 2002.

BENEDETTI, M.S., HOMSLEY, M., NICOLAS, J., YOUNG, C., BALTES, E. Pharmacokinetics and metabolism of ¹⁴C-levetiracetam a new antiepileptic agent, in healthy volunteers. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 59, pp. 621–630, 2003.

BIANCHI, V., ARFINI, C., VIDALI, M. Therapeutic Drug Monitoring of Levetiracetam: Comparison of a Novel Immunoassay With an HPLC Method. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 36, n. 5, 2014.

BLONK, M.I.; VAN DER NAGEL, B.C.; SMIT, L.S.; MATHOT, R.A.A. Quantification of levetiracetam in plasma of neonates by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 878, pp. 675-681, 2010.

BODNAR, M., NIK, J.N., KONIECZKA, P. Validation of a sampling procedure. **Trends in Analytical Chemistry**, v.51, p.117–126, 2013.

BOK-KIM, K.; SEO, K. ; KIM,S.; BAE, S.; KIM, D., SHIN, J. Simple and accurate quantitative analysis of ten antiepileptic drugs in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, pp. 771–777, 2011.

BOONLEANG, J., PIPATRATTANASEREE, W., TANTHANA, C., MAHATTHANATRAKUL, W. HPLC-MS-MS for Simultaneous Determination of Risperidone and 9-hydroxyrisperidone in Human Plasma: Application in a Bioequivalence Study. **Separation Science**, 2014.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Diário Oficial da União nº.185 - Seção 1, 25 de setembro de 2014. Dispõe sobre a atualização do Anexo I, Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial, da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998 e dá outras providências, Brasília – DF, Resolução - RDC Nº 44 de 24 de Setembro de 2014.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Diário Oficial da União nº.151, 10 de agosto de 2015.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para a validação de métodos bioanalíticos. Brasília, DF, Resolução, RDC n.º 27 de 17 de maio de 2012.

BRASIL, CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Dispõe sobre a proibição da utilização de substâncias que destroem a Camada de Ozônio. RESOLUÇÃO nº 267, de 14 de setembro de 2000. Publicada no DOU n. 237, Seção 1, páginas 27-29, de 11 de dezembro de 2000.

BRESSAN, R.A.; PILOWSKY, L.S. Hipótese glutamatérgica da esquizofrenia. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n.3, pp. 5-7, 2003.

BUENO, K.A, CARDOZO, G.B.A.S, COSTA, S.H, SEDLACEK, G. SOBRECARGA EM FAMILIARES DE PACIENTES ESQUIZOFRÊNICOS. 2013, São Paulo, 2 Supl.2 In: 4º Sim Saúde- Simpósio em Saúde 2013, **Anais: Arch Health Invest**, São Paulo, UNIFESP 2013.

CABOVSKA.,B., COX,S.L., VINKS, A.A. Determination of risperidone and enantiomers of 9-hydroxyrisperidone in plasma by LC-MS/MS. **Journal Chromatography B Analytical Technoly Biomedical Life Science**, v. 1, n. 852, pp. 497–504, 2007.

CAI, H., ZHUA, R., LI, H., ZHANG, J., LI, L. Simplex optimization of chromatographic separation and dansyl derivatization conditions in the ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of risperidone,9-hydroxyrisperidone, monoamine and amino acid neurotransmitters in human urine. **Journal of Chromatography B**, v. 879, pp. 1993–1999, 2011.

CALDAS, S.S.; GONÇALVES, F, F.; PRIMEL, E.G.; PRESTES, O.D.; MARTINS, M, L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

CAMPONE, L.; PICCINELLI, A.L.; CELANO, R.; RASTRELLI, L. pH-controlled dispersive liquid–liquid microextraction for the analysis of ionisable compounds in complex matrices: Case study of ochratoxin A in cereals. **Analytica Chimica Acta**, v. 754, p. 61– 66, 2012.

CARRO, A.M., FERNÁNDEZ, S. RACAMONDE, I., GARCÍA-RODRÍGUEZ, D. GONZÁLEZ, P., LORENZO, R.A. Dispersive liquid–liquid microextraction coupled with programmed temperature vaporization-large volume injection-gas chromatography–tandem mass spectrometry for multiclass pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1253, p. 134–143, 2012.

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

CHARMAHALI, G., QOMI, M., AKHAVAN, S., CHAHARMAHALI, M., TAFTI, F.F. Determination of Trace Amounts of Risperidone in Human Urine Sample by Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction Combined with High Performance Liquid Chromatography. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 12, n. 1, p. 539-548, 2015.

CHAVES,A.C.Diferenças entre os sexos na esquizofrenia. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, n. 22, Supl I, p. 21-2, 2000.

CHEMICALIZE, 2016. Disponível em:
<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=levetiracetam&source=fp> Acesso em 09/12/2016.

CHEN, J.; XIONG, C.; RUAN, J.; SU, Z. Dispersive Liquid-liquid Microextraction Combined with High-performance Liquid Chromatography for the Determination of Clozapine and Chlorpromazine in Urine. **Journal Huazhong University Science Technology**, v. 31, n. 2, p. 277-284, 2011.

CHIARARDIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.

CONTIN, M.; MOHAMED, S.; ALBANI, F.; RIVA, R.; BARUZZI, A. Simple and validated HPLC–UV analysis of levetiracetam in deproteinized plasma of patients with epilepsy. **Journal of Chromatography B**, vol. 873, p.129–132, 2008.

CROTTI, A.E.M.; VESSECCHI, R.; CALLEGARI, J.L.; LOPES, N.P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray: processos químicos envolvidos na formação de ions de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, p. 287-292, 2006.

DE OLIVEIRA, A.R.M.; MAGALHÃES, I.R.S.; DE SANTANA, F.J.M.; BONATO, P.S. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n.3, p. 627-644, 2008.

DESPHANDE, L.S., DELORENZO, R.J. Mechanisms of levetiracetam in the control of status epilepticus and epilepsy. **Mini Review Article**, v.5, article 11, p. 1 – 5, 2014.

ESCUDERO, L.B., GRIJALBA, A.C., MARTINIS, E.M., WUILLOUD, R.G. Bioanalytical separation and preconcentration using ionic liquids. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 7597–7613, 2013.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Guideline on bioanalytical method validation. London, United Kingdom. July, 2011. Disponível em: www.ema.europa.eu. Acessado: 21/11/2015.

FARAJZADEH, M.A, KHOSH MARAM, L., SHEYKHIZADEH, S. A Review on Application of Microextraction Techniques for Analysis of Chemical Compounds and Metal Ions in Foodstuffs. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 1-19, 2014.

FERNÁNDEZ, P., REGENJO, M., BERMEJO, M., FERNÁNDEZ, M., LORENZO, R. A., CARRO, A.M. Analysis of drugs of abuse in human plasma by dispersive liquid–liquid microextraction and high-performance liquid chromatography. **Journal Application Toxicology**. v. 35, p. 418–425, 2015.

FONSECA, B.M. MORENO, I.E.D., BARROSO, M., COSTA, S., QUEIROZ, J.A., GALLARDO, E. Determination of seven selected antipsychotic drugs in human plasma using microextraction in packed sorbent and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical Bioanalysis Chemical**, v, 405, p. 3953–3963, 2013.

FORTUNA, A., ALVES, G., FALCAO, A. Chiral chromatographic resolution of antiepileptic drugs and their metabolites: a challenge from the optimization to the application. **Biomedical Chromatography**, 2013.

FREITAS-LIMA, P.; JUNIOR, V.A.; PEREIRA, L.R.L.; FELETTI, F.; PERUCCA, E.; SAKAMOTO, A.C. Influence of enzyme inducing antiepileptic drugs on the pharmacokinetics of levetiracetam in patients with epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 94, p. 117-120, 2011.

FRENCH, J., EDRICH, P., CRAMER, J.A. A systematic review of the safety profile of levetiracetam: a new antiepileptic drug. **Epilepsy Research**, v. 47, p. 77–90, 2001.

FRENCH, J., TONNER, F. The Treatment of Epilepsy: Levetiracetam, New York: S. Shorvon, E. Perucca e J. Engel, 3ª edição. Capítulo 44, 2009.

GANESAN M.; RAUTHAN S. K.; YADAV S. S.; PANDEY Y.; TRIPATHI P. Validated liquid chromatographic ultra violet method for the quantization of levetiracetam in human plasma using liquid–liquid extraction. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 1, n.1, p. 1-9, 2010.

GHAMBARI, H., HADJMOHAMMADI, M. Low-density solvent-based dispersive liquid–liquid extraction followed by high performance liquid chromatography for determination of warfarin in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 899, p. 66–71, 2012.

GONÇALVES, J.L., ALVES, V.L., CONCEIÇÃO, C.J.F., TEIXEIRA, H.M., CÂMARA J.S. Development of MEPS–UHPLC/PDA methodology for the quantification of clozapine, risperidone and their major active metabolites in human urine. **Microchemical Journal**, v. 123, p. 90–98, 2015.

GREINER-SOSANKO, E.; GIANNOUTSOS, S.; LOWER, D.R.; VIRJI, M.A.; KRASOWSKI, M.D. Drug monitoring: simultaneous analysis of lamotrigine, oxcarbazepine, 10-hydroxycarbazepine, and zonisamide by HPLC-UV and a rapid GC method using a nitrogen-phosphorus detector for levetiracetam. **Journal Chromatography Science**, v. 45, n. 9, p. 616–622, 2007.

GUO, T.; OSWALD, L.M.; MENDU, D.R.; SOLDIN, S.J. Determination of levetiracetam in human plasma/serum/saliva by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Clinica Chimica Acta**, v. 375, p. 115–118, 2007.

GURE, A. LARA, F.J., GARCÍA-CAMPAÑA, A.M., MEGERSA, N., OLMO-IRUELA, M. Vortex-assisted ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of sulfonylurea herbicides in wine samples by capillary high-performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 170, p. 348–353, 2015.

HERRERA, A.V.H.; RAMOS, M.A.; BORGES, J.H.; DELGADO, M.A.R. Dispersive liquid–liquid microextraction for determination of organic analytes. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29 p. 728-751, 2010.

HUANG, M.Z., SHENTU, J., ZHOU, H. Determination of risperidone in human plasma by HPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study in Chinese volunteers, 2008, v. 9, n. 2, pp. 114-120, 2008.

HU, X.; WU, J.; QI-FENG, Y. Molecular complex-based dispersive liquid–liquid microextraction: Analysis of polar compounds in aqueous solution. **Journal of Chromatography A**, v. 1217 pp.7010–7016, 2010.

ISOHERRANEN, N.; ROEDER, M.; SOBACK,S.; YAGEN, B.; SCHURING,V.; BIALER, M. Enantioselective analysis of levetiracetam and its enantiomer R-alpha-ethyl-2-oxo-pyrrolidine acetamide using gas chromatography and ion trap mass spectrometric detection. **Journal Chromatography B**, v. 745, pp. 325–332, 2000.

JAIN, D, S.; SUBBAIAH, G.; SANYAL, M.; PAL, U.; SHRIVASTAV, P, S. Determination of levetiracetam in human plasma by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry and its application to bioequivalence studies. **Rapid Communication Mass Spectrometry**, v. 20, pp. 2539–2547, 2006.

JEMAL, M. High-throughput quantitative bioanalysis by LC/MS/MS. **Biomedical Chromatography**, v. 14, pp. 422–429, 2000.

JOUYBAN, A., SOROURADDIN, M.H., FARAJZADEH, M.A., SOMI, M.H., BAKHTIYARI, R.F. Determination of five antiarrhythmic drugs in human plasma by dispersive liquid–liquid microextraction and high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 134, pp. 681–689, 2015.

JOHANN, R.V.O., VAZ, C.E. Condições afetivas e de relacionamento interpessoal em homens portadores de esquizofrenia em tratamento com haloperidol ou clozapina. **Interação em Psicologia**, v, 10, n. 1, pp. 151-156, 2006.

JOHANNESSEN, S.I., TOMSON, T. Pharmacokinetic Variability of Newer Antiepileptic Drugs: When is Monitoring Needed? **Clinical Pharmacokinetics**, v. 45, n. 11, pp. 1061-1075, 2006.

JUENKE, J.M.; BROWN, P.I.; URRY, F.M.; GWENDOLYN, A.M. Drug Monitoring and Toxicology: A Procedure for the Monitoring of Levetiracetam and Zonisamide by HPLC-UV. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 30, pp. 27-30, 2006.

KANG, J., PARK, Y., KIM, S., KIM, S., JUN, M. Modern Methods for Analysis of Antiepileptic Drugs in the Biological Fluids for Pharmacokinetics, Bioequivalence and Therapeutic Drug Monitoring. **Korean Journal Physiology Pharmacology**, v 15, pp. 67–81, 2011.

KAPLAN, H. I.; SADOCK, B. J.; GREBB, J. A. *Compêndio de psiquiatria: ciências do comportamento e psiquiatria clínica*. 7ª edição. Porto Alegre, Artes Médicas, 2007.

KLITGAARD H, MATAGNE A, GOBERT J. Evidence for a unique profile of levetiracetam in rodent models of seizures and epilepsy. **European Journal Pharmacology**, v. 353, pp.191-206, 1998.

LaROCHE, S.M., HELMERS, S.L. The New Antiepileptic Drugs Scientific Review. **The Journal of the American Medical Association**, v. 291, n. 5, 2004.

LEE, J.H.; WOO, Y.; HWANG, I.; KIM, C.; KIM, D.; SHIM, C.; CHUNG, S. Quantification of CKD-501, lobeglitazone, in rat plasma using a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method and its applications to pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, n. 5, p. 872–877, 2009.

LEPPIK, I. E. The place of Levetiracetam in the treatment of epilepsy. **Epilepsia**, vol. 42, p. 44-45, 2001.

LINN, W.D., WOFFORD, M.R., O'KEFFE, M.E., POSEY, L.M. Pharmacotherapy in primary care. Separata de: ROGERS, S. Epilepsy Part 4, Capítulo 15, p. 179 – 189, 2009.

LLERENA, A., BEREZ, R., DORADO, P., SANZ DE LA GARZA, C., NORBERTO, M.J., CÁCERES, M., GUTIÉRREZ, J.R. Determination of risperidone and 9-hidroxyrisperidone in human plasma by liquid chromatography: application to the evaluation of CYP2D6 drug interactions. **Journal Chromatography B**, v. 783, n.1, pp. 213-219, 2003.

MA, J.; LU, W.; CHEN, L. Recent Advances in Dispersive Liquid–Liquid Microextraction for Organic Compounds Analysis in Environmental Water: A Review. **Current Analytical Chemistry**, v. 8, pp. 78-90, 2012.

MANDRIOLI, R., MERCOLINI, L., LATEANA, D., BONCOMPAGNI, G, RAGGI, M.A. Analysis of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma, urine and saliva by MEPS-LC-UV. **Journal of Chromatography B**, v. 879, pp. 167–173, 2011.

MANGELINS, D.; SAEVELS, J.; HEYDEN, Y.D. Enantiomeric impurity determination of levetiracetam using capillary electrochromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, pp. 2827 – 2836, 2006.

MARTENS-LOBENHOFFER, J.; BODE-BÖGER, S.M. Determination of levetiracetam in human plasma with minimal sample pretreatment. **Journal of Chromatography B**, vl. 819, p. 197–200, 2005.

MARTINS, M.L., PRIMEL, E.G., CALDAS, S.S., PRESTES, O.D., ADAIME, M.B., ZANELLA, R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, n. 4, v. 1, pp.35-51, 2012.

MASHAYEKHI, H.A.; AZAR-ABROOMAND, P.; SABER-TEHRANI, M.; WAQIF HUSAIN, S. Rapid Determination of Carbamazepine in Human Urine, Plasma Samples and Water Using DLLME followed by RP–LC. **Chromatographia**, v. 71, pp. 517–521, 2010.

MATAR, K, M. Quantification of levetiracetam in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Application to therapeutic drug monitoring. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, pp. 822–828, 2008.

MAURI, M.C., VOLONTERI, L.S., COLASANTI, A., FIORENTINI, A., DE GASPARI, M.C., BAREGGI, S.R. Clinical Pharmacokinetics of Atypical Antipsychotics: A Critical Review of the Relationship Between Plasma Concentrations and Clinical response. **Clinical Pharmacokinetics**, v, 46, n.5, pp. 359-388, 2007.

MAY, T. W.; RAMBECK, B.; JÜGERS, U. Serum Concentrations of Levetiracetam in Epileptic Patients: The Influence of Dose and Co-medication. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 25, n. 6, pp. 690-699, 2003.

MELWANKI, M.B., FUH, M. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with semi-automated in-syringe back extraction as a new approach for the sample preparation of ionizable organic compounds prior to liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1198–1199, p. 1–6, 2008.

MELWANKI, M.B., CHEN, W., BAI, H., LIN, T., FUH, M. Determination of 7-aminoflunitrazepam in urine by dispersive liquid–liquid microextraction with liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 78, pp. 618–622, 2009.

MENDU, D.R., SOLDIN, S.J. Simultaneous determination of Levetiracetam and its acid metabolite (ucb L057) in serum/plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**, v. 43, pp. 485-489, 2010.

MEULDER, M., REMMERIE, M.M., VRIES, R., SIPS, L.A., BOOM, S., HOOIJSCHUUR, E.W.J. et. al. Validated LC–MS/MS methods for the determination of risperidone and the enantiomers of 9-hydroxyrisperidone in human plasma and urine. **Journal of Chromatography B**, v. 870, pp. 8–16, 2008.

MOREIRA, F.A., GUIMARÃES, F.S. Mecanismos de ação dos antipsicóticos: hipóteses dopaminérgicas, **Medicina**, v. 40, n. 1, pp. 63-71, 2007.

MOREIRA, B.J., YOKOYA, J.M.C., DE GAITANI, C.M. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos, inovações e aplicações biológicas. **Scientia Chromatographica**, v.3, n. 6, pp. 186-204, 2014.

NETO, A.G.A.A., BRESSAN, R.A., BUSATTO FILHO, G. Fisiopatologia da esquizofrenia: aspectos atuais. **Revista de Psiquiatria Clínica**, n. 34, supl 2, pp. 198-203, 2007.

OLIVEIRA, I.R. Antipsicóticos atípicos: farmacologia e uso clínico. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, n. 22, Supl I, p. 38-40, 2000.

PATSALOS, P. N., Pharmacokinetic profile of levetiracetam: toward ideal characteristics. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 85, pp. 77–85, 2000.

PATSALOS, P.N., BERRY, D.J., BOURGEOIS, B.F.D., CLOYD, J.C. et al., Antiepileptic drugs—best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: A position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. **Epilepsia**, pp. 1–38, 2008.

PAYÁN, M.R., LÓPEZ, M.A.B., TORRES, R.F., GONZÁLEZ, J.A.O., MOCHÓN, M.C. Hollow fiberbased liquid phase microextraction (HFLPME) as a new approach for the HPLC determination of fluoroquinolones in biological and environmental. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, pp. 332–341, 2011.

PÉREZ, E.B. Epilepsia e Condições psiquiátricas relacionadas. **Epilepsia**. Pediatria, Capítulo 1.2, p. 1 – 6, 2015.

PERSENIUS, M., RYSTEDT, I., WILDE-LARSSON, B., BÅÅTH, C. Quality of life and sense of coherence in young people and adults with uncomplicated epilepsy: A longitudinal study. **Epilepsy & Behavior**, v. 47, p. 127–131, 2015.

PUCCI, V.; BUGAMELLI, F.; MANDRIOLI, R.; FERRANTI, A.; KENNDLER, E.; RAGGI, M.A. High-performance liquid chromatographic determination of Levetiracetam in human plasma: comparison of different sample clean-up procedures. **Biomedical Chromatography**, v. 18, pp. 37–44, 2004.

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

RADTKE, R.A. Pharmacokinetics of Levetiracetam. **Epilepsia**, v. 42, suplement. 4, p. 24-27, 2001.

RAGGI, M.A., BUGAMELLI, F., SABBIONI, C., SARACINO, M.A. PETIO, C. HPLC-DAD determination of plasma levels of the antipsychotic risperidone and its main metabolite for toxicological purposes. **Journal Science**, v. 28, pp. 245–250, 2005.

RANJBARI, E., GOLBABANEZHAD-AZIZI, A., HADJMOHAMMADI, M.R. Preconcentration of trace amounts of methadone in human urine, plasma, saliva and sweat samples using dispersive liquid–liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 94, p. 116–122, 2012.

RATNARAJ, N.; DOHENY, H.C.; PATSALOS, P. N. Um micrométodo para a determinação do novo antiepiléptico droga levetiracetam (UCB L059) no soro ou plasma por cromatografia líquida de alta performance. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 18, pp. 154-157, 1996.

REMMERIE, B.M.M., SIPS, L.L.A. VRIES, R., JONG. J., SCHOTHUIS, A.M., HOOIJSCHUUR, E.W.J., MERBEL, N.C. V. Validated method for the determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 783, pp. 461–472, 2003.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M.M.; AGHAEI, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, pp. 1–9, 2006.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, pp. 2342-2357, 2010.

REZAEI, M., YAMINI, Y., HOJJATI, M. FARAJI, M. Novel extraction method based on the dispersion of the extraction solvent for extraction of letrozole from biological fluids. **Analytical Methods**, v. 2, p. 1341–1345, 2010.

REZAEI, F., BIDARI, A., BIRJANDI, A.P., HOSSEINI, M.R.M., ASSADI, Y. Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of polychlorinated biphenyls in water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 158, p. 621–627, 2008.

RIBANI, M., BOTTOLI, C.B.G., COLLINS, C.H., JARDIM, I.C.S.F., MELO, L.F.C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, pp. 771-780, 2004.

RIZUTTI, S.; NISHIYAMA, A.N.; MUSZKAT, M.; CAMPOS, C.J.R. Epilepsias – Tratamentos Alternativos. **Revista de Neurociências**, v. 7, n. 1, pp. 32-38, 1999.

ROSSO, A. L., NICARETTA, D. MATTOS, J.P. Diagnóstico e tratamento atual das mioclonias: revisão da literatura , **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 3, n. 47, 2011.

SANTANA, A. F. F. A.; CHIANCA, T. C. M.; CARDOSO, C. S. Qualidade de vida de pacientes com esquizofrenia internados em hospital de custódia. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v.58, n. 3, pp. 187-194, 2009.

SARAJI, M., BOROUJENI, M.K. Recent developments in dispersive liquid–liquid microextraction. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 406, pp. 2027–2066, 2014.

SARAFRAZ-YAZDI, A.; AMIRHASSAN, A. Liquid-phase microextraction. **TrAC-Trends in Analytical Chemistry**, Oxford, v. 29, n. 1, pp. 1-14, 2010.

SARAJI, M., BOROUJENI, M.K., BIDGOLI, A, A, H. Comparison of dispersive liquid–liquid microextraction and hollow fiber liquid–liquid–liquid microextraction for the determination of fentanyl, alfentanil, and sufentanil

in water and biological fluids by high-performance liquid chromatography. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 400, pp. 2149–2158, 2011.

SARAJI, M., BOROUJENI, M.K. Recent developments in dispersive liquid–liquid microextraction. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 406, pp. 2027–2066, 2014.

SHAMSIPUR, M., FATTAHI, N. Extraction and determination of opium alkaloids in urine samples using dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 879, pp. 2978–2983, 2011.

SHIHABI, Z.K.; OLES, K.S.; HINSDALE, M. Analysis of the antiepileptic drug Keppra by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1004, pp. 9–12, 2003.

SOLTANI, S., RAMEZANI, A.M., SOLTANI, N., JOUYBAN, A. Analysis of losartan and carvedilol in urine and plasma samples using a dispersive liquid liquid microextraction isocratic HPLC-UV method. **Journal of Chromatography B**, v. 879, pp. 2978–2983, 2012.

SWAROOP, H.S., ANANYA, C., NITHIN, K., JAYASHANKAR, C., SATISH, B.H.V., SRINIVAS, B.N. Levetiracetam: A Review of its use in the treatment of epilepsy. **International Journal of Medicine and Biomedical Research**, v.2, n. 3, 2013.

TABRIZI, A.B.; TUTUNCHI, N.S. Analysis of Piroxicam in Pharmaceutical Formulation and Human Urine by Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Combined with Spectrophotometry. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 3, n.1, p. 37-44, 2013.

TALEBIANPOOR, M.S., KHODADOUST, S., ROZBEHI, A., TOORI, M.A et al. Application of optimized dispersive liquid liquid microextraction for determination of melatonin by HPLC-UV in plasma samples. **Journal of Chromatography B**, v. 960, p. 1-7, 2014.

TIAN, J.; CHEN, X.; BAI, X. Comparison of dispersive liquid–liquid microextraction based on organic solvent and ionic liquid combined with high-performance liquid chromatography for the analysis of emodin and its metabolites in urine samples. **Journal of Separation Science**, v. 35, p. 145–152, 2012.

TRANCHIDA, P.Q., FRANCHINA, F.A., DUGO, P., MONDELLO, L. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: recent evolution and current trends. **Mass Spectrometry Reviews**, XX, p. 1–11, 2014.

TRUJILLO-RODRÍGUEZ, M.J., ROCÍO-BAUTISTA, P., PINO, V., AFONSO, A.M. Ionic liquids in dispersive liquid-liquid microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 51, p. 87–106, 2013.

VALARMATHY, J.; SAMUELJOSHUA, L.; RATHINAVEL, G.; THANUJA,C.S.; SIVAKUMAR, T. RP-HPLC Method Development and Validation for Assay of Levetiracetam in Tablet Dosage Form. **Journal of Pharmacy and Research Technology**, v. 1, n.3, 2008.

VERMEJI, T. A. C.; EDELBROEK, P.M. High-performance liquid chromatographic and megabore gas-liquid chromatographic determination of levetiracetam (ucbL059) in human serum after solid-phase extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 662, pp. 134-139, 1994.

VERMEJI, T. A. C.; EDELBROEK, P.M. Robust isocratic high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of seven antiepileptic drugs including lamotrigine, oxcarbazepine and zonisamide in serum after solid-phase extraction. . **Journal of Chromatography B**, v. 857, pp. 40–46, 2007.

WEB OF SCIENCE: SCIENCE DIRECT. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/>. Acessado em: 20/01/2016.

WEIJENBERG, A., BROUWER, O.F., CALLENBACH, P.M.C. Levetiracetam Monotherapy in Children with Epilepsy: A Systematic Review, **CNS Drugs**, v. 29, pp.371–382, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. EPILEPSY. Disponível em: <http://www.who.int/topics/epilepsy/en/>. Acessado em: 26/11/2015.

WU, T.; LIU, Y.; YANG, Z.; GAO, H.; ZHOU, Z. Determination of Pyrethroid Pesticides in Environmental Samples using Ionic Liquid Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v. 23, n. 7, pp. 1327-1333, 2012.

XIONG, C.; RUAN, J.; CAI, Y.; TANG, Y. Extraction and determination of some psychotropic drugs in urine samples using dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, pp. 572–578, 2009.

YAN, H., WANG, H. Recent development and applications of dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1295, pp. 1–15, 2013.

YAO, C.; LI, T.; TWU, P.; PITNER, W.R. ANDERSON, J.L. Selective extraction of emerging contaminants from water samples by dispersive liquid–liquid microextraction using functionalized ionic liquids. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, pp.1556–1566, 2011.

YAZDI, A.S., RAZAVI, N., YAZDINEJAD, R.S. Separation and determination of amitriptyline and nortriptyline by dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography flame ionization detection. **Talanta**, v. 75, pp. 1293–1299, 2008.

ZANG, X.; WU, Q.; ZHANG, M.; XI, G.; WANG, Z. Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 37, n. 2, pp. 161–168, 2009.

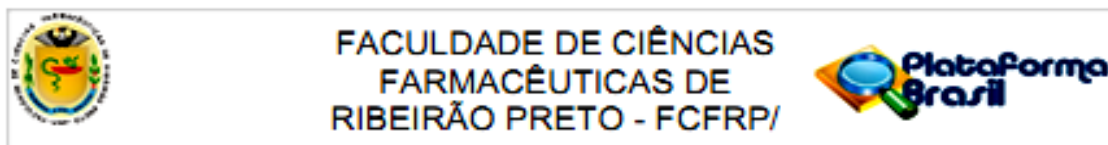
ZHANG, G., TERRY, A.V., BARTLETT, M.G. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of olanzapine,risperidone,9-hydroxyrisperidone,clozapine, haloperidol and ziprasidone in rat plasma. **Rapid Communication Mass Spectrometry**, v. 21, pp. 920–928, 2007.

ZHAO, X.; FU, L.; HU, J.; LI,J.; WANG,H.; CHANGJIANG, H.; WANG, X. Analysis of PAHs in Water and Fruit Juice Samples by DLLME Combined with LC-Fluorescence Detection. **Full Short Communication**, 2009.

ZUFÍA, L.; ALDAZ, A.; IBÁÑEZ, N.; GIRÁLDEZ, J.; VITERI, C. LC. Method for therapeutic drug monitoring of levetiracetam: Evaluation of the assay performance and validation of its application in the routine area. **Clinical Biochemistry**, v. 43, pp. 473–482, 2010.

ANEXO

Aprovação do Comitê de Ética da FCFRP-USP



Continuação do Parecer: 898.318

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Ver Conclusões.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram incluídas para apreciação: novas versões de TCLE para os participantes do grupo controle e participantes para o novo fármaco (risperidona); nova versão do projeto de pesquisa; nova Declaração dos Pesquisadores.

Recomendações:

Aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A emenda está devidamente justificada. Os TCLE atendem as recomendações da Resolução 466/12.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda aprovada pelo CEP/FCFRP em sua 137ª reunião ordinária. Em atendimento às Resoluções vigentes, deverá ser encaminhado ao CEP, através da Plataforma Brasil, o relatório final da pesquisa conforme modelo de Relatório aprovado pelo Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção da mesma. Informamos que, de acordo com a Resolução 466/12, Item IV.5, letra d, o TCLE deve "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada (s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha". Sugerimos que o TCLE seja apresentado ao sujeito da pesquisa em documento impresso frente e verso.