

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Eveline Camillo

Desenvolvimento de método para a determinação de nicotina e clozapina em plasma humano
utilizando CLAE-UV

Brasília
2014

Eveline Camillo

Desenvolvimento de método para a determinação de nicotina e clozapina em plasma humano
utilizando CLAE-UV

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação de Ciências da
Saúde, Universidade de Brasília, como
requisito parcial à obtenção do título de Mestre
em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni

Co-orientador: Prof. Dr. Mauricio Homem-de-Mello

Brasília
2014

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de
Brasília. Acervo 1016368.

Camillo, Eveline.

C183d Desenvolvimento de método para a determinação de nicotina
e clozapina em plasma humano utilizando CLAE-UV /
Eveline Camillo. -- 2014.
86 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília,
Programa de Pós-Graduação de Ciências da Saúde, 2014.

Inclui bibliografia.

Orientação: Luiz Alberto Simeoni ; Co-orientação:
Mauricio Homem-de-Mello.

1. Clozapina. 2. Nicotina. 3. Fumo - Vício. I. Simeoni,
Luiz Alberto. II. Mello, Mauricio Homem de. III. Título.

CDU 613.84

Eveline Camillo

Desenvolvimento de método para a determinação de nicotina e clozapina em plasma humano utilizando CLAE-UV

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em __ de _____ de 2014.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Mauricio Homem-de-Mello - UnB

Prof. Dra. Yris Maria Fonseca - UnB

Prof. Dr. Alexandre Fonseca – UnB

*Ao meu esposo, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão,
carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste
trabalho*

AGRADECIMENTOS

A Deus, nosso pai, pela fé que anima a batalha

A minha família, pelo apoio nas minhas decisões

Em memória, a minha querida mãe, eterna fonte de inspiração

Ao professor Maurício, pela orientação e confiança no meu trabalho

Ao professor Simeoni pela orientação e oportunidade

Ao professor Carlos, pela colaboração no desenvolvimento do trabalho, compreensão e amizade

À professora Eloisa, pelo apoio e por abrir as portas do LabTox para nosso projeto

A todas as meninas do LabTox pelo apoio, em especial Érica e Patricia, pelas vezes que deixaram suas tarefas de lado para sanar minhas dúvidas e me orientar no trabalho.

À querida Flávia, pela dedicação em me acompanhar no projeto

A meus amigos de trabalho, em especial ao Antonio, pela cooperação

À professora Andréa, pela compreensão

Aos professores, colegas de trabalho, do curso de farmácia da Unb pelas palavras de apoio

A todos meus amigos e amigas que de alguma forma contribuíram durante meu mestrado

À FAPDF pelo apoio financeiro

À empresa Cristália pela doação dos padrões analíticos

À UnB e ao PPGCF

RESUMO

CAMILLO, Eveline.

Desenvolvimento de método para a determinação de nicotina e clozapina em plasma humano utilizando CLAE-UV. Brasília 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.).

A quantificação simultânea da NCT e CLZ em plasma humano utilizando CLAE-UV pode proporcionar benefícios quanto a monitorização terapêutica do fármaco em paciente tabagistas que sofrem de esquizofrênia, pois a variação na concentração plasmática da CLZ causada pela NCT pode resultar em resposta negativa ao tratamento e até uma possível intoxicação do fármaco. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia para quantificação de nicotina e do fármaco clozapina juntamente com seu metabólito principal, a N-desmetilclozapina (N-CLZ), em plasma humano. A extração foi realizada por extração líquido-líquido em clorofórmio e a quantificação dos analitos deu-se por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e detecção espectrofotométrica (arranjo de fotodiodos), em coluna monolítica de fase reversa. A eluição da fase móvel seguiu um gradiente metanol:acetonitrila:tampão acetato (0,025 mol L⁻¹ pH 5) iniciando-se com maior proporção de fase aquosa (FA) 95% e subindo gradativamente a fase orgânica (FO), atingindo em 4 minutos maior proporção em fase orgânica 55% e, a seguir, voltou-se à proporção inicial, finalizando a corrida em 6 minutos e vazão de 4 mL.min⁻¹. A validação da metodologia analítica seguiu legislação estabelecida pela ANVISA. O método descrito obteve r superior a 0,997 para ambos os analitos com faixa linear de 100 a 1000 µg.L⁻¹ e 1500 a 5250 µg.L⁻¹ para CLZ e NCT, respectivamente. O LD para CLZ e NCT foi de 70 e 1000 µg.L⁻¹, enquanto o LIQ foi de 100 e 1500 µg.L⁻¹, respectivamente. Precisão e exatidão intradia no LIQ ficaram abaixo de 16% para ambos os analitos.

PALAVRAS-CHAVE: Clozapina, N-Desmetilclozapina, Nicotina, CLAE.

ABSTRACT

CAMILLO, Eveline. Method development for the determination of nicotine and clozapine in human plasma samples using HPLC-UV. Brasília 2014. Dissertation (Masters in Pharmaceutical Sciences – Faculty of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia, 2013.).

The simultaneous quantification of NCT and CLZ in human plasma using HPLC-UV can provide benefits as a therapeutic drug monitoring in smokers patient suffering from schizophrenia, because the variation in plasma concentration of CLZ caused by the NCT can result in a negative response to treatment, and to a possible toxicity of the drug. The aim of this work was to develop and validate a method for the quantification of nicotine, clozapine and its main metabolite, N-desmethylozapine (N-CLZ), in human plasma. The extraction was carried by liquid-liquid extraction with chloroform and the quantification performed by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and detection in photodiode array in reverse phase monolithic column. Mobile phase elution followed a gradient of methanol:acetonitrile:acetate buffer (0.025 M, pH 5), starting with a greater proportion of aqueous phase, 95%, and increasing the organic phase steadily, reaching the highest organic phase proportion, 55%, in 4 min and then returning to the initial proportion, completing a run in 6 min with a flow of 4 mL.min⁻¹. Analytical method validation was performed within the norms established by ANVISA (Brazilian Health Surveillance Agency). The described method was above 0.997 r² for both analytes in the linear range from 100 to 1000 µg.L⁻¹ and 1500-5250 µg.L⁻¹ to CLZ-1 and NCT, respectively. LD for CLZ and NCT and 1000 was 70 µg.L⁻¹, while the LIQ of 100 and 1500 was µg.L⁻¹, respectively. Intraday precision and accuracy were below the LIQ of 16 % for both analytes.

KEYWORDS: Clozapine, N-desmethylozapine, Nicotine, HPLC.

Sumário

RESUMO	7
ABSTRACT	8
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABELAS	14
ABREVIATURAS	16
INTRODUÇÃO:	17
1 REFERENCIAL TEÓRICO	19
1.1 Nicotina.....	19
1.2 Clozapina.....	20
1.3 Interação entre clozapina e nicotina	22
1.4 Cromatografia na determinação da Clozapina e Nicotina	23
1.5 Coluna Monolítica	26
1.6 Métodos de extração	29
1.6.1 Extração Líquido-líquido	30
1.7 Validação	31
1.7.1 Seletividade.....	32
1.7.2 Linearidade	33
1.7.3 Precisão e exatidão.....	34
1.7.4 Estabilidade.....	35
1.7.5 Limite de Detecção - LD	35
1.7.6 Limite Inferior de Quantificação - LIQ	36
1.7.7 Efeito residual	37
1.7.8 Efeito de matriz.....	37
2 OBJETIVOS	38
2.1 Objetivo Principal	38

	10
2.2 Objetivo Secundário	38
3 PARTE EXPERIMENTAL:	39
3.1 Metodologia.....	39
3.1.1 Preparação de soluções:	39
3.2 Desenvolvimento da metodologia em HPLC.....	40
3.2.1 Sistema Cromatográfico:	42
3.3 Desenvolvimento da extração	42
3.4 Validação	45
3.4.1 Seletividade.....	46
3.4.2 Linearidade	46
3.4.3 Limite de detecção e limite de quantificação.....	47
3.4.4 Precisão e Exatidão	47
3.4.5 Estabilidade.....	47
3.4.6 Efeito de Matriz	48
3.4.7 Efeito Residual.....	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Metodologia em HPLC.....	49
4.1.1 Fase móvel:	52
4.1.2 Condições Cromatográficas	53
4.2 Amostra	54
4.2.1 Avaliação do perfil cromatográfico das amostras.....	54
4.3 Avaliação dos testes de extração.....	57
4.3.1 Preparação das Amostras	64
4.4 Validação	65
4.4.1 Seletividade.....	65
4.4.2 Linearidade	66
4.4.3 Limite de detecção e limite de quantificação.....	67
4.4.4 Precisão e Exatidão	69
4.4.5 Estabilidade.....	74
4.4.6 Efeito de Matriz	75
5 CONCLUSÕES	76
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
FIGURA 1 Estrutura molecular da NCT	18
FIGURA 2 Estrutura molecular da CLZ	22
FIGURA 3 Corte Transversal do bastão cilíndrico de sílica monolítica e sua ampliação (MALDANER, et al. 2010)	26
FIGURA 4 Esquema de uma fase estacionária monolítica (SILVA, COLLINS e BOTTOLI, 2011)	27
FIGURA 5 Esquema das principais etapas empregadas na amostra (LANÇAS, 2009)	29
FIGURA 6 Fluxo das etapas envolvidas durante o preparo da amostra para análise cromatográfica.	29
FIGURA 7 Cromatogramas de testes isocráticos utilizando metanol e água deionizada como FM. 1) 40%, 2)50%, 3)60% e 4)80% Metanol.	48
FIGURA 8 Curvas Analíticas para CLZ em diferentes comprimentos de onda. a) 260 nm, b)297 nm.	49
FIGURA 9 Curva Analítica da NCT no comprimento de onda de 260 nm.	50
FIGURA 10 Estudo dos volumes de injeção. 1)20, 2)30, 3)50, 4)60 e 5)90 µL. Sendo NCT (a), PI (b) e CLZ (c).	50
FIGURA 11 Esquema de gradiente de eluição utilizado para determinação de NCT, CLZ e N-CLZ.	52
FIGURA 12 Cromatograma de amostra branco (bolsa 1). Condições: Sistema em gradiente de acordo com a Tabela 1, coluna monolítica de fase reversa Chromolith® SpeedROD RP-18 4,6x50 mm 2 µm, fluxo 4 mL.min ⁻¹ , comprimento de onda estudado 260 nm, temperatura de trabalho 25°C, tempo de corrida de 6 min e volume de injeção de 30 µL.	53
FIGURA 13 Cromatograma de amostra branco (bolsa 2). Condições: Sistema em gradiente de acordo com a Tabela 1, coluna monolítica de fase reversa Chromolith® SpeedROD RP-18 4,6x50 mm 2 µm, fluxo 4 mL.min ⁻¹ , comprimento de onda estudado 260 nm,	54

temperatura de trabalho 25°C, tempo de corrida de 6 min e volume de injeção de 30 µL.

- FIGURA 14** Cromatograma de amostra branco (plasma de aluna do LabTox). **55**
Condições: Sistema em gradiente de acordo com a Tabela 1, coluna monolítica de fase reversa Chromolith® SpeedROD RP-18 4,6x50 mm 2 µm, fluxo 4 mL.min⁻¹, comprimento de onda estudado 260 nm, temperatura de trabalho 25°C, tempo de corrida de 6 min e volume de injeção de 30 µL.
- FIGURA 15** Cromatograma da extração em plasma utilizando TCA 20%. **56**
Sistema em gradiente de acordo com a Tabela 4, coluna monolítica de fase reversa Chromolith® SpeedROD RP-18 4,6x50 mm 2 µm, fluxo 4 mL.min⁻¹, comprimento de onda estudado 260 nm, temperatura de trabalho 25°C, tempo de corrida de 6 min e volume de injeção de 30 µL.
- FIGURA 16** Cromatograma da extração em plasma utilizando Acetonitrila. **57**
Sistema em gradiente de acordo com a Tabela 4, coluna monolítica de fase reversa Chromolith® SpeedROD RP-18 4,6x50 mm 2 µm, fluxo 4 mL.min⁻¹, comprimento de onda estudado 260 nm, temperatura de trabalho 25°C, tempo de corrida de 6 min e volume de injeção de 30 µL.
- FIGURA 17** Cromatograma da extração em plasma utilizando metodologia Wohlfarth 2011. Sistema em gradiente de acordo com a Tabela 4, coluna monolítica de fase reversa Chromolith® SpeedROD RP-18 4,6x50 mm 2 µm, fluxo 4 mL.min⁻¹, comprimento de onda estudado 260 nm, temperatura de trabalho 25°C, tempo de corrida de 6 min e volume de injeção de 30 µL. **58**
- FIGURA 18** Cromatograma da extração em plasma utilizando metodologia SPE. Sistema em gradiente de acordo com a Tabela 4, coluna monolítica de fase reversa Chromolith® SpeedROD RP-18 4,6x50 mm 2 µm, fluxo 4 mL.min⁻¹, comprimento de onda estudado 260 nm, temperatura de trabalho 25°C, tempo de corrida de 6 min e volume de injeção de 30 µL. **59**
- FIGURA 19** Cromatograma da extração em plasma utilizando metodologia **60**

França 2013. Sistema em gradiente de acordo com a Tabela 4, coluna monolítica de fase reversa Chromolith® SpeedROD RP-18 4,6x50 mm 2 µm, fluxo 4 mL.min⁻¹, comprimento de onda estudado 260 nm, temperatura de trabalho 25°C, tempo de corrida de 6 min e volume de injeção de 30 µL.

- FIGURA 20** Cromatograma da extração em plasma utilizando metodologia Linda 1983. Sistema em gradiente de acordo com a Tabela 4, coluna monolítica de fase reversa Chromolith® SpeedROD RP-18 4,6x50 mm 2 µm, fluxo 4 mL.min⁻¹, comprimento de onda estudado 260 nm, temperatura de trabalho 25°C, tempo de corrida de 6 min e volume de injeção de 30 µL. **61**
- FIGURA 21** Esquema de extração **63**
- FIGURA 22** Cromatograma de amostra extraída no limite de quantificação. a) NCT e CLZ. Condições: Sistema em gradiente de acordo com a Tabela 1, coluna monolítica de fase reversa Chromolith® SpeedROD RP-18 4,6x50 mm 2 µm, fluxo 4 mL.min⁻¹, comprimento de onda estudado 260 nm, temperatura de trabalho 25°C, tempo de corrida de 6 min e volume de injeção de 30 µL. **64**
- FIGURA 23** Curvas de calibração. 1) NCT com PI e 2) NCT sem PI. Condições: Sistema em gradiente de acordo com a Tabela 1, coluna monolítica de fase reversa Chromolith® SpeedROD RP-18 4,6x50 mm 2 µm, fluxo 4 mL.min⁻¹, comprimento de onda estudado 260 nm, temperatura de trabalho 25°C, tempo de corrida de 6 min e volume de injeção de 30 µL. **65**
- FIGURA 24** Curvas de calibração. 1) CLZ com PI e 2) CLZ sem PI. Condições: Sistema em gradiente de acordo com a Tabela 1, coluna monolítica de fase reversa Chromolith® SpeedROD RP-18 4,6x50 mm 2 µm, fluxo 4 mL.min⁻¹, comprimento de onda estudado 260 nm, temperatura de trabalho 25°C, tempo de corrida de 6 min e volume de injeção de 30 µL. **65**

ÍNDICE DE TABELAS

	PÁGINA
TABELA 1 Levantamento bibliográfico referente as técnicas de cromatografia empregadas nos ultimos 13 anos para clozapina e outras substâncias.	23
TABELA 2 Levantamento bibliográfico referente as técnicas de cromatografia empregadas nos ultimos 14 anos para nicotina e outras substâncias.	24
TABELA 3 Tipos de extração em cromatografia líquida para os analitos em estudo.	50
TABELA 4 Gradiente de eluição desenvolvido para determinação de NCT, CLZ e N-CLZ.	51
TABELA 5 Regressão Linear dos dados e limites de detecção e de quantificação obtidos na determinação simultânea de NCT e CLZ.	66
TABELA 6 Limite de detecção e quantificação do método utilizando a razão sinal/ruído.	66
TABELA 7 Limite de detecção e quantificação do método utilizando os parâmetros da curva de calibração.	67
TABELA 8 Dados de precisão e exatidão intracorridas na concentração do limite de quantificação, para um valor teórico de 1500 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para NCT e CLZ, respectivamente.	68
TABELA 9 Dados de precisão e exatidão intracorridas em concentração baixa (CQB), para um valor teórico de 3000 e 300 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para NCT e CLZ, respectivamente.	69
TABELA 10 Dados de precisão e exatidão intracorridas em concentração média (CQM), para um valor teórico de 3750 e 650 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para NCT e CLZ, respectivamente.	69
TABELA 11 Dados de precisão e exatidão intracorridas em concentração alta (CQA), para um valor teórico de 4200 e 8000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para NCT e CLZ, respectivamente.	70
TABELA 12 Dados de precisão e exatidão intercorridas no limite de	70

quantificação (LIQ), para um valor teórico de 1500 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para NCT e CLZ, respectivamente.

TABELA 13	Dados de precisão e exatidão intercorridas na concentração baixa (CQB), para um valor teórico de 3000 e 300 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para NCT e CLZ, respectivamente.	71
TABELA 14	Dados de precisão e exatidão intercorridas na concentração média (CQM), para um valor teórico de 3750 e 650 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para NCT e CLZ, respectivamente.	71
TABELA 15	Dados de precisão e exatidão intercorridas na concentração alta (CQA), para um valor teórico de 4200 e 800 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para NCT e CLZ, respectivamente.	72
TABELA 16	Dados de estabilidade de curta duração na concentração baixa e alta (CQB e CQA), para um valor teórico de 3000 e 4200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para NCT e 100 e 800 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para CLZ.	73
TABELA 17	Dados para análise do efeito de matriz na concentração baixa e alta (CQB e CQA), para um valor teórico de 3000 e 4200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para NCT e 100 e 800 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para CLZ.	74

ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BRZ	Bromazepam
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLZ	Clozapina
CQB	Controle de Qualidade Baixa
CQM	Controle de Qualidade Médio
CQA	Controle de Qualidade Alta
CV	Coefficiente de Variação
DP	Desvio Padrão
FA	Fase aquosa
FE	Fase Estacionária
FHB	Fundação Hemocentro de Brasília
FM	Fase Móvel
FMN	Fator de Matriz Normalizado
FO	Fase Orgânica
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LD	Limite de Detecção
LIQ	Limite inferior de Quantificação
LSQ	Limite superior de Quantificação
N-CLZ	N-desmetilclozapina
NCT	Nicotina
TCA	Ácido Tricloroacético
UV	Ultra Violeta
USP	United States Pharmacopeia

INTRODUÇÃO:

A esquizofrenia é uma doença que atinge o sistema nervoso central e que apresenta sintomas psicóticos positivos e negativos. Os sintomas positivos são alucinações, delírios, perturbações do comportamento motor, enquanto os negativos são pobreza de discurso, ausência de expressão de sentimentos, falta de motivação e isolamento social. Estes comportamentos estão relacionados a uma das características diagnósticas da esquizofrenia que devem persistir por no mínimo um mês, de acordo com os critérios da DSM V (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais), pois correspondem aos sintomas negativos da esquizofrenia (TANDON et al., 2013).

O tratamento medicamentoso de pacientes que sofrem de esquizofrenia é realizado com antipsicóticos inibidores das funções psicomotoras. Dentre os medicamentos mais utilizados no tratamento está a clozapina (CLZ), um neuroléptico atípico, que atua principalmente em receptores serotoninérgicos e dopaminérgicos. Estudos mostram que a grande parte dos pacientes esquizofrênicos é tabagista, cerca de duas a três vezes mais do que na população em geral (TANG et al., 2005). São muitas as características clínicas que levam os esquizofrênicos a fumar, dentre elas a idade, o sexo, a gravidade da doença ou, ainda, este hábito é uma forma de automedicação no alívio aos surtos. Doses maiores de CLZ, normalmente são prescritas a pacientes tabagistas que sofrem de esquizofrenia. Diante dessas informações faz-se necessário um tratamento diferenciado para esses pacientes, os quais sofrem de distúrbios psicóticos.

Estudos mostram que a nicotina (NCT) e outras substâncias existentes no cigarro interferem no funcionamento de enzimas hepáticas que são responsáveis pela metabolização da CLZ, causando variação na concentração deste fármaco no organismo. (MCEVOY; FREUDENREICH; WILSON, 1999; SANDSON, 2007; TANG et al., 2007), no entanto também há pesquisas que demonstram não existir diferença significativa entre fumantes e não fumantes e suas respectivas dosagens de CLZ (LEON et al., 2005). Até o momento não foi possível encontrar nenhum trabalho que quantifique NCT, CLZ e seu principal metabólito juntos em uma única amostra de matriz biológica utilizando cromatografia líquida com detecção no ultravioleta. Isso porque tanto a NCT quanto a CLZ possuem características químicas muito distintas, que dificultam sua quantificação simultânea em CLAE.

O objetivo do trabalho foi quantificar e validar o método em matriz biológica. Para isso, utilizou-se um método cromatográfico que pudesse separar eficientemente, de forma rápida e mais simples possível, os três analitos. A cromatografia utilizando detector

ultravioleta foi o método escolhido, por ser de fácil acesso em clínicas e Universidades. Mas, para que a metodologia fosse rápida e simples, foi necessário testar várias formas de extração. Neste trabalho testou-se a utilização de coluna monolítica para separação, a qual possibilita o trabalho em altas vazões, produz corridas em pequeno espaço de tempo e oferece baixa pressão; além de possuir, teoricamente, características ótimas para a matriz em estudo, já que possibilita o uso de matrizes complexas.

Por fim, a quantificação simultânea da NCT e CLZ em plasma humano utilizando CLAE-UV pode proporcionar benefícios no que se refere a monitorização terapêutica do fármaco em paciente tabagistas que sofrem de esquizofrênia, pois a variação na concentração plasmática da CLZ causada pela NCT pode resultar na resposta negativa ao tratamento e até uma possível intoxicação do fármaco.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Nicotina

A 3-[(2S)-1-metil-2-pirrolidina]piridina, nicotina (NCT) é um alcaloide obtido das folhas da planta do tabaco (*Nicotiana sp.*), de fórmula molecular $C_{10}H_{14}N_2$, e apresenta propriedades psicoativas, induzindo dependência física e química. Seus principais metabólitos são a cotinina e cotinina-N-óxido (ROSEMBERG, 2004). Sua estrutura molecular está representada na Figura 1.

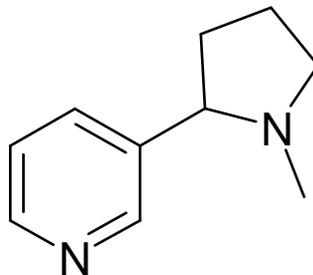


Figura 1: Estrutura molecular da NCT

A NCT é uma substância que possui coloração amarela pálida, apresenta-se como um líquido oleoso com desagradável odor pungente e se exposto à luz ou ao ar sua coloração se torna gradualmente marrom. A NCT é miscível em água quando abaixo de 60°C , também é miscível em etanol, clorofórmio, éter de petróleo, óleos e querosene; possui pK_a 's em 3,2 e 7,9 (25°C) e seu Coeficiente de Partição (Log P) octanol/água é de 1,2, o comprimento de onda máximo de absorção no espectro ultravioleta é 259 nm para soluções ácidas e em soluções básicas 261 nm (MOFFAT, 2005).

O uso do tabaco é realizado em todo o mundo por mais de um bilhão de pessoas e vários países em desenvolvimento apresentam alta prevalência do tabagismo (ROSEMBERG, 2004).

A NCT é absorvida rapidamente após o fumo do tabaco e em altos níveis chega até o cérebro, entre 10 e 20 segundos após a tragada. Essa forma de absorção leva a NCT ao cérebro mais rapidamente do que a via intravenosa (BENOWITZ, 1996). As concentrações plasmáticas no sangue arterial situam-se entre 20 e 60 ng.mL⁻¹ após o uso de um cigarro. Logo após a primeira tragada, as concentrações plasmáticas podem chegar a 7 ng.mL⁻¹ (LUNELL et al., 2000). Após 20 minutos do término do cigarro, os níveis plasmáticos de nicotina caem rapidamente devido à sua ampla distribuição pelos tecidos. O volume de distribuição da nicotina é de cerca de 2,6 vezes o peso corporal (ROSE et al., 1999).

Já foi demonstrado que a NCT é capaz de induzir, *in vitro*, as isoformas das enzimas CYP1A2 e CYP1A1 em células pulmonares de rato (PRICE et al., 2004) e *in vivo* em fígado, rins e pulmão de ratos (IBA et al., 1998; IBA e FUNG, 1999; IBA et al., 1999), e também em cérebro de camundongos e ratos (ANANDATHEERTHAVARADA et al., 1993; SINGH et al., 2008). Entretanto, HUKKANEN et al. (2011) demonstraram que a NCT não foi capaz de induzir a atividade mediada pela CYP1A2 em humanos.

1.2 Clozapina

A 8-cloro-11-(4-metil-1-piperazinil)-5H-dibenzo[b,e][1,4]diazepina, usualmente conhecida como clozapina (CLZ), é um derivado dibenzodiazepínico, tricíclico, de fórmula molecular C₁₈H₁₉ClN₄. Sua estrutura cristalina possui cor amarelada, apresentando ponto de fusão em 183°C. Possui pK_a's em 3,70 e 7,60 e seu coeficiente de partição (Log P) octanol/água é de 3,23. Em soluções ácidas seus comprimentos de onda máximos de absorção no espectro ultravioleta são em 245 e 297 nm e em soluções básicas 238, 261 e 297 nm (MOFFAT, 2005). Seus principais metabólitos observados em mamíferos são a N-desmetilclozapina (N-CLZ), farmacologicamente ativa, e a clozapina N-óxido, ambos formados pelo sistema microsomal hepático do Citocromo P450 (CYP) (MOFFAT, 2005). As estruturas moleculares da clozapina e da N-desmetilclozapina estão representadas na Figura 2.

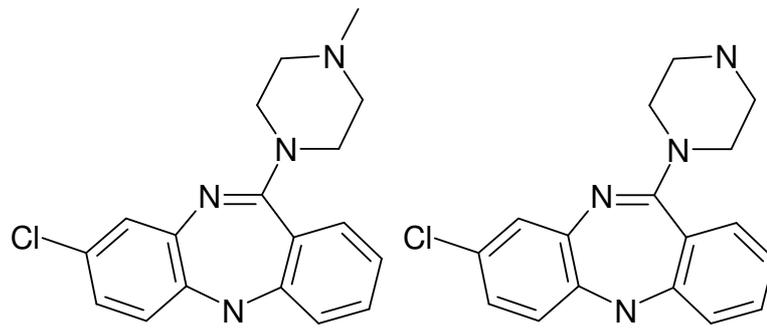


Figura 2: Estruturas moleculares da Clozapina e de seu metabólito N-Desmetilclozapina.

A CLZ é um fármaco da classe dos antipsicóticos atípicos, ou de segunda geração. A atribuição atípica é utilizada pelo menor perfil de efeitos extrapiramidais, como convulsões e parkinsonismo, em contraposição aos antipsicóticos típicos, de primeira geração. Essa característica deve-se à sua baixa afinidade por receptores dopaminérgicos do tipo D2, os quais limitam a produção significativa da síndrome extrapiramidal, típica entre os fármacos mais antigos dessa categoria (TIMOTEO, 2008). Por outro lado, o uso da CLZ é restrito devido aos seus efeitos secundários, como agranulocitose e colvulsões (ALVIR et al., 1993; DEVINSKY & PACIA, 1994).

Em humanos, as formulações farmacêuticas contendo CLZ são rapidamente absorvidas. A concentração plasmática máxima (C_{max}) é alcançada entre 1,5 e 2 horas após a ingestão, e a meia vida está entre 6 e 17 horas, por via oral. O máximo de efeito é alcançado cerca de 4 horas após a administração do medicamento (JANN et al., 1993; MOFFAT, 2005). A CLZ é extensivamente metabolizada, principalmente (mas não somente) via CYP1A2 em seus dois principais metabólitos, a N-CLZ ou norclozapina e a clozapina n-óxido. Porém, esta última apresenta-se em baixas quantidades no plasma de pacientes em tratamento, inversamente a N-CLZ que está presente em quantidades significativas (VARDAKOU et al., 2010). Normalmente, as doses diárias de CLZ em pacientes adultos apresentam concentrações entre 300 a 600 mg por dia, contudo, caso a dose-resposta não seja satisfatória, é possível que a dosagem seja aumentada, gradualmente, para 900 mg por dia. Já suas concentrações plasmáticas podem girar em torno de 350 a 600 $ng \cdot mL^{-1}$. Devido à sua grande variabilidade farmacocinética, a influência de diversas isoenzimas do CYP sobre seu metabolismo e a ampla faixa de dose que um indivíduo pode estar submetido, a clozapina é alvo frequente de monitorização terapêutica (WOHLFARTH et al., 2011)

Uma vez que a sua concentração no plasma é altamente variável devido à dose indivíduo, a probabilidade de resposta ao tratamento pode ser monitorada não apenas pela avaliação do estado clínico do paciente, mas, também, pela medição da concentração plasmática (WALDSCHMITT; PFUHLMANN; HIEMKE, 2009).

Pacientes tabagistas normalmente necessitam de doses maiores de CLZ para alcançar o mesmo efeito de pacientes não tabagistas. A ausência repentina do tabaco em usuários de CLZ pode ser bastante perigosa, porque a diminuição na indução enzimática mediada pela nicotina pode aumentar a concentração do fármaco no plasma, resultando em uma possível intoxicação pela CLZ (SHARIF, 2003).

1.3 Interação entre clozapina e nicotina

Leon J. e colaboradores, em 2005, levantaram informações sobre a interação entre a CLZ e a NCT em artigos publicados entre o ano de 1995 e 2002. A literatura por eles avaliada sugeriu que o tratamento com o antipsicótico clozapina leva a uma pequena diminuição do índice de tabagismo em pacientes esquizofrênicos. Para testar estas informações, os autores utilizaram o plasma de 38 pacientes esquizofrênicos, divididos em cinco grupos, com doses do medicamento diferentes para cada grupo. Analisaram CLZ e cotinina, maior metabolito gerado pela NCT, em cromatografia a gás, e observaram que em nenhum dos cinco grupos ocorreu efeito significativo da CLZ sobre o hábito de fumar.

Seguindo a mesma linha, estudos anteriores realizados por McEvoy J.P. e colaboradores (1999) descrevem que a nicotina poderia ter efeitos “terapêuticos” no sentido de normalizar déficits auditivos e anormalidades visuais. Segundo eles, a existência de componentes na fumaça do cigarro poderia interferir no funcionamento de enzimas hepáticas oxidativas, causando a aceleração no metabolismo da CLZ. Nesse sentido, os autores pesquisaram, através de cromatografia gasosa, o soro de pacientes fumantes e não fumantes tratados com CLZ, e não observaram diferenças significativas entre estes dois grupos. No entanto, a retirada abrupta do tabaco em usuários de CLZ pode causar alteração significativa na concentração plasmática do fármaco, devido à diminuição na indução enzimática mediada pelo tabaco (SANDSON et al., 2007).

Em 2007, um estudo clínico realizado em pacientes esquizofrênicos mostrou correlação entre NCT e a CLZ. Tang e colaboradores observaram que os fumantes em comparação com não fumantes eram mais propensos a ter baixos níveis de educação, taxas

mais elevadas de divórcio, maior frequência de recaídas psicóticas e tinham a CLZ como mais provável neuroléptico a ser prescrito, cerca de 49,1% contra 32,5% do total de entrevistados, o que pode sugerir associação entre o uso da CLZ e o tabagismo para este tipo de população. Ainda nesse mesmo estudo, os autores descrevem que a abstinência do tabaco agrava os sintomas psicóticos e isso pode ser devido ao fato de que o cigarro em doentes mentais é visto como uma forma de automedicação, já que a NCT pode modular a atividade de dopamina no cérebro servindo de “alívio” dos sintomas presentes na esquizofrenia.

Pesquisas anteriores revelaram que a CLZ prejudicava, enquanto a nicotina melhorava a precisão dos ratos em executar tarefas de detecção de sinal visual (REZVANI et al., 2002). Em 2007, estes mesmos autores (REZVANI et al., 2007) publicaram um estudo sobre os efeitos destas duas substâncias na deficiência de atenção em esquizofrênicos. Eles mostraram que o uso concomitante delas bloqueava os efeitos benéficos de cada uma isoladamente. Mais recentemente, outra evidência sobre a interferência da CLZ nos efeitos da NCT foi descrita quanto a locomoção de ratos (HAKAN et al., 2009).

1.4 Cromatografia na determinação da Clozapina e Nicotina

Os métodos para determinação de fármacos em amostras biológicas, tais como plasma, sangue, tecidos e urina na faixa de $\mu\text{g.L}^{-1}$ ou ng.mL^{-1} geralmente são baseados em extrações líquido-líquido ou em fase sólida seguidos de determinação cromatográfica. Na maioria dos casos, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) – *High Performance Liquid Chromatography* em inglês (*HPLC*) – é o método físico-químico de separação mais utilizado. Esta técnica está baseada na interação diferenciada do analito com a fase móvel (FM) líquida e a fase estacionária (FE) imiscível e fixa, mais conhecida como coluna cromatográfica. A interação particular de cada substância existente na amostra com estas fases é que vai determinar como ocorrerá a separação. Considerando a existência de um grande número de FMs e FEs, a técnica pode ser aplicada para analitos com diversas características, resultando em metodologias versáteis e eficientes (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010).

A cromatografia líquida tem evoluído fortemente nos últimos anos, especialmente na área farmacêutica que necessita sempre de suporte e de instrumentos que ofereçam procedimentos rápidos e eficientes para análises qualitativas e quantitativas de fármacos. Um dos motivos é o aumento no número de amostras analisadas que demandam redução nos

custos e tempo de análise. Para isso, a cromatografia tem se mostrado uma importante ferramenta em aplicações farmacêuticas (FEKETE et al, 2013).

A determinação do fármaco CLZ é geralmente reportada na literatura empregando cromatografia, porém outras técnicas também são empregadas, como, por exemplo, a eletroquímica (SHAHROKHIAN; KAMALZADEH; HAMZEHLOEI, 2013). A Tabela 1 mostra o levantamento bibliográfico realizado no Web of Science™ (palavras chaves de busca: *clozapine* e *chromatography*) referente ao emprego de técnicas cromatográficas para quantificação da CLZ nos últimos 13 anos.

Tabela 1: Levantamento bibliográfico referente as técnicas de cromatografia empregadas nos últimos 13 anos para clozapina e outras substâncias.

Ano de publicação	Autores	Técnica	Fase Estacionária	Amostra
2013	FONSECA et al.	CG-MS/MS	5% fenil metilsiloxano	Plasma
2013	KAUR et al.	LC/UV	C18	Plasma
2012	URINOVSKÁ et al.	LC-MS/MS	C18	Soro
2011	WOHLFARTH et al.	LC-MS/MS	Fenil éter	Soro
2010	VARDAKOU et al.	CG/MS	5% fenil metilsiloxano	Plasma
2009	SONG et al.	LC-MS/MS	C18	Plasma
2009	MING et al.	UPLC-MS/MS	C18	Soro
2009	MADEJ et al.	LC/UV	C18	Plasma
2009	WALDSCHMITT et al.	LC/UV	(C8 + ciano propril)	Soro
2006	MERCOLINI L. et al.	LC/UV	C8	Plasma
2003	ZHOU et al.	LC/MS	C18	Plasma
2002	MOSIER et al.	LC/UV	CN	Plasma
2002	SHEN et al.	LC/UV	C18	Plasma
2001	ARAVAGIRI et al.	LC-MS/MS	C18	Plasma
2001	LIU et al.	LC/UV	C18	Plasma

O levantamento bibliográfico mostra que, até o ano de 2009, a cromatografia líquida com detecção ultravioleta prevalecia entre as técnicas utilizadas para determinação do fármaco clozapina. No entanto, apesar do avanço tecnológico e do aumento do uso da espectrometria de massas nos últimos anos, ainda pode-se observar que a detecção ultravioleta tem sido utilizada em pesquisas. Um dos motivos é a facilidade de manuseio e obtenção deste equipamento, cujo custo é menor se comparado a técnicas mais avançadas.

Por outro lado, na Tabela 2, o levantamento bibliográfico realizado no Web of ScienceTM (palavras chave de busca: *nicotine* e *chromatography*) para a determinação da nicotina demonstra que, nos últimos anos, as técnicas mais utilizadas têm sido cromatografia a gás ou líquida acopladas a espectrômetro de massas.

Tabela 2: Levantamento bibliográfico referente as técnicas de cromatografia empregadas nos últimos 13 anos para nicotina e outras substâncias.

Ano de publicação	Autores	Técnica	Fase Estacionária	Amostra
2013	YASUDA et al	LC-Fluorescência	C18	Soro
2012	SCHEIDWEILER et al.	LC-MS/MS	Fenil – éter	Urina
2011	DOBRINAS et al.	UPLC-MS/MS	C18	Plasma
2011	XU et al.	LC-MS/MS	C18	Plasma
2010	BAUMANN et al.	LC/MS	C18	Soro
2009	SHAKLEYA et al.	LC-MS/MS	C18	Plasma
2006	JABLONSKI et al.	LC/UV	C18	Alimentos
2005	CHANG et al.	LC/UV	Fenil – hexil	Sangue e cérebro
2003	STOLKER et al.	LC-MS/MS	C18	Plasma
2000	NAKAJIMA et al.	LC/UV	C18	Plasma
2000	GHOSHEH et al.	LC/UV	Ácido sulfônico	Plasma

O avanço tecnológico tem possibilitado a aplicação de novas técnicas de detecção tais como a espectrometria de massas, que acoplada a técnicas de separação cromatográfica incrementam as possibilidades analíticas, especialmente os limites de detecção. No entanto, como já mencionado, a utilização do LC/UV é ainda muito empregada devido ao custo relativamente baixo, tanto para aquisição como para manutenção dos equipamentos, e, também, devido à grande versatilidade na aplicação, seja em instituições públicas ou privadas

de ensino e pesquisa. Outro ponto a considerar é que a quantificação simultânea das duas substâncias em questão, tem sido realizada por cromatografia gasosa (LEON et al., 2005; MCEVOY; FREUDENREICH; WILSON, 1999).

1.5 Coluna Monolítica

A FE (em fase reversa) em CLAE normalmente consiste em uma camada orgânica apolar ligada quimicamente (imobilizada) ou ainda sorvida em um suporte cromatográfico (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010). Convencionalmente, a CLAE utiliza colunas empacotadas com pequenas partículas de sílica (4 μm) que impõem altas pressões de trabalho, sendo que a fase móvel deve ser controlada com muita precisão, empregando bombas específicas. Por isso, a denominação cromatografia líquida de alta pressão ou usualmente de alta eficiência, a qual gera elevado desempenho na separação (LANÇAS, 2009).

A escolha da coluna em cromatografia líquida exerce papel limitante nos resultados experimentais, pois é ela que fornece o meio de separação para as substâncias. Escolher a coluna adequada para cada tipo de amostra é fundamental para obtenção de uma sequência de resultados favoráveis.

A fim de ampliar as possibilidades de separação, foram propostos diversos tipos de fases estacionárias, sendo que a diminuição no tamanho de partícula gerou grande interesse e provocou o aparecimento de uma nova técnica denominada UHPLC – do inglês *ultra high performance liquid chromatography* – na qual as pressões de trabalho são muito altas, por volta de 27.579 KPa, alcançada através de bombas mais sofisticadas, o que exige o uso de equipamentos específicos de elevado custo.

Um dos maiores avanços no desenvolvimento de fases estacionárias é a denominada coluna monolítica. Inserida no fim da década de 80, seu desenvolvimento aumentou e, conseqüentemente, sua popularização no meio acadêmico também. Este tipo de fase estacionária é composta por um bloco sólido poroso único, ao contrário das colunas convencionais que são compostas por milhares de partículas porosas. O monolito é dividido em macroporos (dimensão média de 2 μm), que permitem alta vazão de fase móvel com baixa pressão, e mesoporos (tamanho médio de 13 nm), que formam uma estrutura porosa fina, o que permite elevado desempenho nas separações (EL DEEB, 2011). A Figura 3 mostra a imagem dos macroporos e mesoporos de uma coluna monolítica. Com estas características diferenciadas, a fase monolítica, além de ser utilizada em coluna de separação, também tem

sido empregada como material para microextração em fase sólida (HEFNAWY; AL-OMAR; JULKHUF, 2009). Esse material também é resistente a condições extremas de pH, podendo ser utilizada na faixa de pH entre 2 e 8 (SAUNDERS et al, 2009).

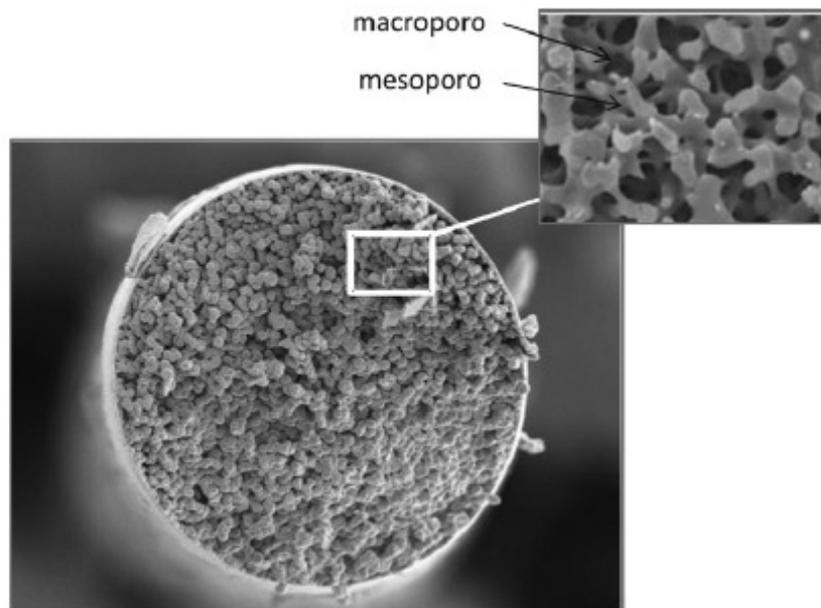


Figura 3: Corte transversal do bastão cilíndrico de sílica monolítica e sua ampliação (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010)

O processo de preparação da sílica monolítica dá-se por sol-gel. Primeiramente, mistura-se um dos compostos tetrametoxissilano ou tetraetoxissilano a um agente porogênico em água contendo um catalisador apropriado e levado a uma temperatura de 0°C; forma-se, então, uma suspensão coloidal, o sol, que posteriormente sofrerá policondensação e se transformará em gel. Após alguns dias, esse gel, já em forma de cilindro, é banhado em solução aquosa de solvente apropriado para que ocorra a formação das estruturas mesoporosas. Em seguida, a estrutura acondicionada em molde de policarbonato passa por secagem e evaporação, o que resulta em encolhimento da estrutura. Esse cilindro então é retirado do molde e é encapsulado em um tubo de material plástico, o qual sofre aquecimento e comprime o monolito. Devido a esse processo, os monolitos utilizados em CLAE não podem ser preparados em colunas cromatográficas de aço inoxidável. Posteriormente, esse monolito é funcionalizado em modo de fase reversa através de reação com agente silano apropriado. Os monolitos utilizados em CLAE possuem pequenos

domínios e canais – Figura 4 – que auxiliam no mecanismo de difusão de troca de massa dinâmico, proporcionando altas vazões de trabalho, com pressão necessária baixa (689,47 KPa), aumentando a eficiência da coluna e possibilitando rápida determinação cromatográfica comparável à UHPLC, porém num sistema de cromatografia convencional (GUILLARME et al, 2010), não sendo necessária a troca do sistema de propulsão de fluidos. Essa vantagem faz com que este material seja aplicado na análise de fármacos (FARIA et al, 2006). Em levantamento bibliográfico, foi apontada a redução no tempo de análise se comparada a uma coluna convencional (de até 8 vezes na determinação de princípios ativos e produtos de degradação oxidativa de um antibiótico) e, também na separação de um maior número de espécies (quatro antidepressivos, mianserin e metabólitos) em apenas 5 minutos com bons parâmetros de validação. Um segundo motivo atribuído à coluna monolítica quanto à redução do tempo de análise é o comprimento desta, cerca de 5 cm. No entanto, seu desempenho pode resultar comprometido, já que a quantidade de pratos teóricos é diretamente proporcional ao comprimento da coluna e, por esse motivo estas colunas podem apresentar perda de eficiência se comparadas às convencionais (FEKETE et al, 2013).

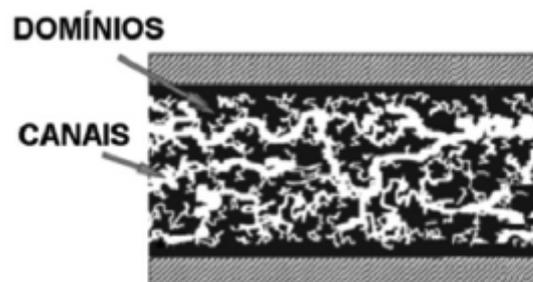


Figura 4: Esquema de uma fase estacionária monolítica (SILVA; COLLINS; BOTTOLI, 2011)

Por possuir estrutura relativamente biocompatível a amostras complexas, como amostras de plasma extraído, os monólitos apresentam vida útil prolongada sem diminuir sua eficiência. Hoje, a maioria das fases monolíticas em CLAE de fase reversa é aplicada em separações de análise de fármacos, peptídios e proteínas (FARIA et al, 2006).

Como desvantagem, os monólitos possuem menor área superficial, o que diminui a sua capacidade de interação, o que causa alargamento de picos e aumento caudal. Em contrapartida, colunas convencionais apresentam lenta transferência de massa por difusão, proporcionando maior contato e interação entre partícula e analito, o que faz com que o aumento caudal dos picos seja reduzido. Outro ponto negativo é quanto à reprodutibilidade

que é inferior se comparada às colunas convencionais, além do uso limitado em análise de rotinas, devido à limitação de fornecedores comerciais.

1.6 Métodos de extração

Para que as amostras biológicas possam ser analisadas em CLAE, é necessário que haja previamente algum tipo de purificação da amostra antes da introdução desta no equipamento analítico. Algumas etapas devem ser empregadas até que uma alíquota da amostra seja introduzida no cromatógrafo para a análise. As principais etapas envolvidas na determinação da amostra estão apresentadas na Figura 5.

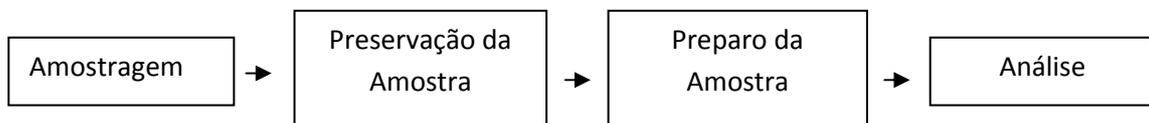


Figura 5: Esquema das principais etapas empregadas na amostra (LANÇAS, 2009).

A etapa de amostragem é importante porque a representatividade da população é essencial e, sem ela, os resultados obtidos serão de pouca valia. A preservação da amostra é outra etapa fundamental para obterem-se bons resultados, ou seja, desde a amostragem até o momento da análise, é imprescindível garantir a integridade da amostra tanto física quanto quimicamente. A etapa seguinte, o preparo da amostra, tem como finalidade adequar o analito a ser determinado às condições da técnica e do método a ser utilizado. Várias operações são necessárias dependendo da natureza da amostra, da matriz e da concentração dos analitos a serem determinados – conforme Figura 6:

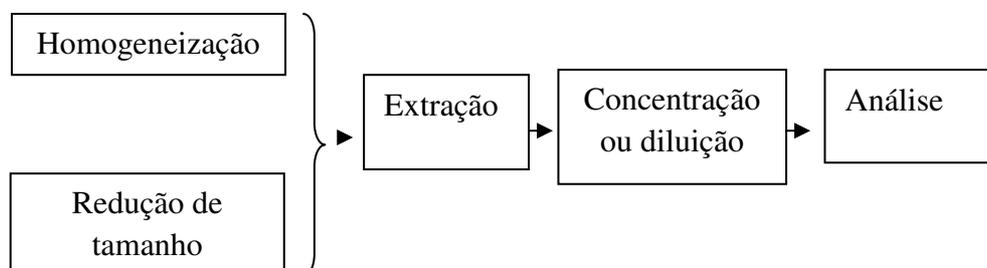


Figura 6: Fluxos das etapas envolvidas durante o preparo da amostra para análise cromatográfica.

A extração consiste na remoção do analito da matriz original, transferindo-o para um solvente apropriado. Ela é considerada uma etapa crítica do processo, muitas vezes mais trabalhosa, demorada e propensa a erros, principalmente se o método for bioanalítico. São muitas as técnicas de extração disponíveis para o preparo de amostras para análise via cromatografia líquida, dentre elas, a extração líquido-líquido, fluido pressurizado (sólido ou semissólido), líquido-sólido e técnicas de miniaturização sem solventes (LANÇAS, 2009).

1.6.1 Extração Líquido-líquido

A técnica consiste no emprego de duas fases imiscíveis, denominadas de fase A e fase B. A fase A contém o soluto de interesse e à medida que a fase B entra em contato com ela, através da agitação, ocorre a distribuição do soluto de interesse entre as duas fases. Em seguida, as fases são colocadas em repouso e, então, separadas mecanicamente para que a fase que contenha o soluto de interesse seja usada em outras operações (LANÇAS, 2009).

A extração líquido-líquido – LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction* – é uma das técnicas mais empregadas em fluidos biológicos quando CLZ e NCT precisam ser determinados. A Tabela 3 mostra o levantamento bibliográfico realizado na Web of ScienceTM (palavras chave de procura: *liquid-liquid extraction* e *chromatography liquid*) de estudos que utilizaram alguns tipos de extrações para os analitos CLZ ou NCT com outros fármacos ou metabólitos em análise cromatográfica líquida para amostras biológicas.

Tabela 3: Tipos de extração em cromatografia líquida para os analitos em estudo.

Autores/Ano	Método de análise	Matriz	Tipo de extração
KAUR H. et al, 2013	HPLC-UV	Plasma humano	Líquido-líquido
YASUDA M. et al, 2013	HPLC-F*	Soro Humano	Líquido-líquido
WOHLFARTH A. et al, 2011	LC-MS-MS	Soro Humano	Líquido-líquido
MADEJ K. et al, 2009	HPLC-UV	Plasma humano	Líquido-líquido
SHAKLEYA D.M., 2009	LC-MS-MS	Plasma humano	Fase sólida
SONG M. et al, 2009	LC-MS-MS	Plasma humano	Líquido-líquido
MING D.S. et al, 2009	UPLC-MS-MS	Soro Humano	Líquido-líquido
MERCOLINI L. et al, 2006	HPLC-UV	Plasma humano	Fase sólida
CHANG Y. et al, 2005	HPLC-UV	Sangue e cérebro de rato	Microdiálise
NAKAJIMA M. et al, 2000	HPLC-UV	Plasma humano	Líquido-líquido

*Fluorimetria

Amostras biológicas, como plasma e tecidos, possuem natureza complexa devido a compostos macromoleculares, como proteínas e substâncias endógenas não voláteis. Tornam-se, desta forma, amostras de difícil extração do analito, exigindo maior tempo e cuidado do analista, já que a impureza necessita ser removida da amostra e separada dos analitos para eliminar possíveis interferências de matriz. Outro fator importante a considerar na preparação da amostra é a pré-concentração, uma vez que pode favorecer o aumento da sensibilidade, e está diretamente relacionada a melhoras no limite de detecção e quantificação da metodologia.

A LLE possui como vantagens a simplicidade e o baixo custo, o que permite aplicar a metodologia para um grande número de amostras. Embora possam aparecer as desvantagens do uso de grandes volumes de solventes potencialmente tóxicos e o tempo despendido para sua execução, o gerenciamento adequado dos resíduos e a possibilidade de otimizar o procedimento compensam, em grande parte, a aplicação desta técnica.

1.7 Validação

A validação é a comprovação por ensaios de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (BRASIL, 2012). É, também, a fase posterior ao

desenvolvimento do método ou otimização, podendo abranger um ou mais analitos, matrizes e instrumentos. Se não conduzido de maneira adequada, esses dados analíticos podem levar a decisões errôneas e a grandes prejuízos. Por isso, a necessidade de que o método analítico possa gerar informações confiáveis e reproduzíveis.

O termo validação é um conceito constantemente atualizado pelas agências reguladoras. A Eurachem Working Group define a validação como uma exigência analítica na qual o método sob investigação se mostra consistente para a aplicação requerida. Para a USP – *United States Pharmacopeia* – a validação é uma evidência documentada que assegura credibilidade ao método, o qual pode ser utilizado em análises rotineiras. Vários outros grupos de trabalho nacionais e internacionais definem o conceito de validação, juntamente com seus parâmetros, sendo que muitos deles são divergentes. Contudo, vale salientar que existem razões legais para a implementação da validação em métodos analíticos de separação. No Brasil, a ANVISA e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) são as agências credenciadas para verificar a competência de laboratórios de ensaios. Elas lançam as resoluções, documentos com poder de lei, que definem os procedimentos para validação de métodos analíticos (RIBANI et al, 2004).

Neste trabalho optou-se por seguir a guia de validação da ANVISA (BRASIL, 2012), que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Apesar do interesse da pesquisa não ser acerca do registro ou pós-registro de medicamentos, acredita-se que essa seja a melhor guia no que se refere à validação de procedimentos bioanalíticos.

Vários trabalhos, disponíveis na literatura, relatam a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Em geral, os principais critérios que devem ser seguidos durante seu desenvolvimento são os seguintes: linearidade, seletividade, estabilidade, precisão e exatidão, limite de detecção e de quantificação. Além destes, para estudos bioanalíticos, a ANVISA na sua resolução de número 27 de 2012, solicita também o efeito residual e efeito de matriz.

1.7.1 Seletividade

A seletividade trata-se da capacidade que o método possui de determinar e diferenciar o analito de outros componentes que possam estar presentes na amostra, por exemplo, substâncias endógenas, metabólitos e impurezas, compostos de degradação e componentes da matriz em geral (HARTMANN et al, 1998). Ela garante que o pico de resposta seja

essencialmente o analito de interesse e, se não for assegurada, compromete seriamente alguns parâmetros, tais como: linearidade, precisão e exatidão.

Em muitos casos, os conceitos seletividade e especificidade podem ser misturados. Alguns autores afirmam que o termo especificidade refere-se a um método que produz uma resposta para um único analito, enquanto o termo seletividade refere-se a um método que fornece resposta a um grupo de entidades químicas que podem, ou não, ser distinguíveis uma das outras (LANÇAS, 2009 e RIBANI et al, 2004).

Existem várias formas de se avaliar a seletividade, porém algumas são mais utilizadas, dentre elas: a comparação entre a matriz isenta do analito de interesse e a matriz adicionada do analito (padrão). Outra maneira de avaliação é a comparação dos espectros do pico obtido na matriz com os analitos com o de um padrão em solvente. Estes ensaios confirmam a presença do analito de interesse na amostra e a extinção de qualquer interferente na região cromatográfica deste (RIBANI et al, 2004).

1.7.2 Linearidade

Considerando que a resposta analítica dos métodos instrumentais é indireta, faz-se necessário estabelecer uma curva analítica ou curva de calibração entre os sinais obtidos e a concentração de padrões. A linearidade nestes gráficos corresponde à capacidade do método de fornecer resultados em função da concentração da substância de interesse. Ela é determinada através de gráficos de curvas de calibração, seguidas de tratamentos estatísticos que devem envolver, no mínimo, a equação da função, a análise da regressão e os dados de correlação e determinação.

Para métodos bioanalíticos, a curva de calibração deve ser preparada em matriz, geralmente realizada com adição de padrão e com uma faixa de calibração uniformemente espaçada em toda sua extensão. Normalmente, se exige um mínimo de 5 a 8 níveis de calibração e um número suficiente de repetições por nível. Em seguida, é necessário encontrar um modelo matemático que descreva adequadamente a relação entre concentração e resposta. Geralmente, os modelos lineares são preferíveis, no entanto, se necessário, modelos não-lineares devem ser utilizados. No caso da área de toxicologia analítica, o modelo de regressão de mínimos quadrados é de uso comum (PETERS; DRUMMER; MUSSHOF, 2007).

A equação para o modelo de regressão de mínimos quadrados é descrita como: $y = ax \pm b$, que só possui validade em determinado intervalo de concentração. Esta equação gera um

gráfico que está baseado na resposta do equipamento em função de várias concentrações do analito em estudo. O eixo horizontal ou “x”, variável independente, relaciona as várias concentrações preparadas do padrão analítico da substância de interesse; enquanto o eixo vertical ou “y”, variável dependente, relaciona o sinal analítico obtido para cada concentração do padrão. A equação da função é uma reta composta pelos coeficientes angular “a” e linear “b”, os quais expressam a inclinação do gráfico em relação aos eixos e a intersecção do gráfico com os eixos, respectivamente (LANÇAS, 2009). Além dos coeficientes de regressão, a e b, a equação da função pode calcular também o coeficiente de correlação (r), que demonstra a qualidade da curva gerada. Quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão dos pontos experimentais e menor a incerteza quanto aos coeficiente de regressão.

1.7.3 Precisão e exatidão

A precisão mede a concordância entre os resultados obtidos em condições experimentais idênticas para a mesma amostra. Usualmente, ela é avaliada pelo desvio padrão ou coeficiente de variação das replicatas.

Desvio Padrão	Coeficiente de Variação
$s_{xo} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})^2}{m-1}}$	$CV = \frac{s_{xo}}{\bar{x}} \times 100$

Onde:

\bar{x} é a média das concentrações, x_i é o valor individual de cada replicata e m é o número de replicatas.

Já a exatidão mede o quanto o valor obtido assemelha-se ao valor verdadeiro ou aceito como verdadeiro, considerado o valor teórico ou, ainda, valor de referência. Ela é usualmente avaliada pelo erro absoluto ou erro relativo. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica.

Segundo a ANVISA (BRASIL, 2012), tanto na exatidão quanto na precisão, deve-se utilizar um valor mínimo de quatro concentrações como controle de qualidade (CQ), sendo

uma no limite de quantificação e as seguintes nas concentrações baixa, média e alta e, para cada uma dessas concentrações, cinco determinações devem ser realizadas, no mínimo. A concentração de controle de qualidade baixa (CQB) deve ser de até três vezes o valor do limite inferior de quantificação (LIQ); já a concentração do controle de qualidade médio (CQM) deve ser a média entre o limite inferior e superior de quantificação (LSQ - maior concentração do analito na curva de calibração preparada na matriz); e a concentração do controle de qualidade alta (CQA) deve estar entre 75 e 85% da maior concentração da curva de calibração. Faz-se necessário para estes dois parâmetros realizar ensaios intra-dia, ou seja, no mesmo dia e em inter-dia, medida ao longo de vários dias. Para ambos os parâmetros, recomenda-se, no máximo, uma variação de 20% para o LIQ (limite inferior de quantificação) e 15% para as demais concentrações.

1.7.4 Estabilidade

A estabilidade é o ensaio que determina se a concentração do analito em estudo se mantém dentro de limites estabelecidos, numa dada matriz, sob condições específicas. Ela fornece a confiabilidade necessária ao método porque garante que a amostra envelhecida fornecerá resultados sem riscos de serem rejeitados por erros metodológicos. No caso de amostras biológicas, tempos longos de estocagem podem aumentar a probabilidade de degradação dos analitos e, conseqüentemente, comprometer os resultados dos ensaios. Contudo, esses erros podem ser minimizados se esse tempo de degradação for conhecido (RIBANI et al, 2004).

Segundo a ANVISA (BRASIL, 2012), a estabilidade é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal. Ela pode ser determinada utilizando um mínimo de três amostras nas concentrações do controle de qualidade baixo e alto definidos pelo pesquisador. Essas concentrações devem ser determinadas através da curva de calibração recém-preparada.

1.7.5 Limite de Detecção - LD

O Limite de Detecção diz respeito à mínima concentração do analito que pode ser observada para um determinado nível de confiança. O LD pode ser obtido através da curva de

calibração, empregando o desvio padrão. Usualmente é empregado o desvio padrão do branco

$$LD = 3,3 \times (s/S)$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação.

S = inclinação ou coeficiente angular da curva de calibração.

Para estudos bioanalíticos, a ANVISA (BRASIL, 2012) recomenda que a curva deverá ser feita em matriz extraída, juntamente com os analitos de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de detecção.

O LD também pode ser determinado utilizando o método visual ou o método sinal-ruído. No método visual, emprega-se a menor concentração visível de tal modo que o ruído e o sinal analítico possam ser distinguíveis. Já o método relação sinal-ruído é empregado quando o método analítico apresenta o ruído da linha de base. Nesse caso, uma concentração mínima é estabelecida quando se compara sinais de amostras em concentrações baixas conhecidas com um branco dessa amostra. As proporções aceitas na relação sinal/ruído são de 3:1 ou 2:1 (RIBANI et al, 2004).

1.7.6 Limite Inferior de Quantificação - LIQ

O Limite Inferior de Quantificação corresponde à menor quantidade de um analito numa amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. Os métodos para calcular o LIQ são os mesmos utilizados para o LD. Contudo, na utilização do método baseado em parâmetros da curva de calibração, a equação passa a ser:

$$LIQ = 10 \times (s/S)$$

A relação sinal-ruído também passa a ser 10:1. Vale ressaltar que o LIQ possui grande impacto na determinação dos parâmetros precisão e exatidão. Isso porque quanto menor a concentração do LIQ, maior a probabilidade de variabilidade nas replicatas de uma mesma concentração, impactando significativamente nos parâmetros de precisão e exatidão.

1.7.7 Efeito residual

Efeito residual é aquele gerado pelo aumento do sinal do analito ou padrão interno (PI) ou ainda o surgimento de picos interferentes no tempo de retenção da substância de interesse ou PI. Este efeito pode ser causado por contaminação proveniente da amostra analisada.

1.7.8 Efeito de matriz

Efeito matriz é o efeito na resposta do analito ou PI, causado por componentes da matriz biológica que, possivelmente, irão influenciar na medição de concentrações. Para a FDA - *Food and Drug Administration* -, o efeito de matriz é observado como um aumento ou diminuição da resposta do detector quando comparado às soluções do analito em solvente.

De acordo com a ANVISA (BRASIL, 2012), o efeito de matriz é realizado com amostras de matriz processadas, posteriormente adicionadas ao analito e PI, nas mesmas concentrações das amostras de CQB e CQA. Para cada amostra é obtido o fator de matriz normalizado por PI (FMN). Abaixo segue a fórmula:

$$\text{FMN} = (\text{Resposta do analito em matriz} / \text{Resposta do PI em matriz}) / (\text{Resposta do analito em solução} / \text{Resposta do PI em solução})$$

O CV% dos FMNs relativos às amostras de plasma deve ser inferior a 15%.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Principal

- Desenvolver um procedimento analítico, empregando CLAE com detecção espectrofotométrica no ultravioleta e coluna monolítica para a determinação de Nicotina e Clozapina em plasma humano.

2.2 Objetivo Secundário

- Avaliar diferentes tipos de tratamento de amostra, especialmente extração líquido-líquido, em busca de um método eficiente, de baixo custo e com boa recuperação.
- Avaliar os diferentes parâmetros de operação e de validação, procurando um método rápido, de baixo custo e menos contaminante para o meio ambiente.
- Quantificar a nicotina, a clozapina e seu metabólito, N-Desmetilclozapina adicionados em plasma humano.

3 Parte experimental:

3.1 Metodologia

3.1.1 Preparação de soluções:

- **Preparação das soluções estoques:**

Para o preparo das soluções estoques de CLZ – pureza 99,7% (Cristália[®]) e N-CLZ – pureza 99% (Santa Cruz Biotechnology[®]) foram pesados 5 mg de cada analito em balança analítica modelo AUW220D (Shimadzu[®]). Em seguida, dissolveu-se essa quantidade de massa em 2 mL de metanol grau HPLC e transferiu-se quantitativamente cada uma dessas soluções para balão volumétrico de 5 mL, então aferiu-se o volume com metanol grau HPLC. Homogeneizou-se e transferiu-se a solução para um frasco âmbar. O mesmo foi feito para o PI, Bromazepam (BRZ) – pureza 100% (Roche[®]). Para preparar a NCT - Dihidrogenoditartarato de (-) Nicotina - pureza $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich[®]), foi necessário pesar 14,2 mg da droga. Dissolveu-se a NCT em 2 mL de metanol grau HPLC, transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 5 mL e aferiu-se o volume com metanol grau HPLC. Homogeneizou-se e transferiu-se a solução para um frasco âmbar seguida de armazenagem em freezer a -20°C . A solução trabalho foi feita em balão volumétrico de 10 mL. Primeiramente transferiu-se 5 mL de metanol grau HPLC para o balão volumétrico, em seguida foi adicionado a esse metanol 10, 20 e 20 μL das soluções de NCT ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), CLZ ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e N-CLZ ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), respectivamente. Logo após, aferiu-se o volume com metanol grau HPLC. Homogeneizou-se e transferiu-se a solução para um frasco âmbar seguida de armazenagem em freezer a -20°C .

- **Preparação do Tampão Acetato de Sódio 25 mmol L^{-1} , pH 5:**

A preparação do tampão utilizado na FM envolveu a dissolução de 1,13 g de acetato de sódio (CH_3COONa) (J.T.Baker[®]) pesado em balança semi-analítica modelo JH2102 (Bioprecisa[®]) em 1000 mL de água ultrapura (Millipore[®]). O pH foi ajustado em 5, com ácido acético PA (Vetec[®]), com medidor de pH modelo mPA-210 (Casalab[®]). Após o preparo, e

antes da análise, o tampão obtido foi filtrado em membrana PTFE 0,45 μm (Millipore[®]) com o auxílio de um sistema de filtração a vácuo. Em seguida, a solução tampão foi levada ao ultrassom por cerca de 20 minutos para retirada de bolhas.

3.2 Desenvolvimento da metodologia em HPLC

Com o propósito de desenvolver uma metodologia simples, rápida e de baixo custo, foram realizados diversos testes, como fase móvel isocrática ou gradiente, vazão, volume de injeção e PI, para estabelecer as melhores condições de separação. A temperatura do forno foi mantida em 25°C em todos os experimentos.

Duas colunas foram testadas, a primeira foi uma coluna de fase reversa C18 ACE5 de 5 μm e dimensões 125x4 mm e, a segunda, uma coluna monolítica fase reversa Chromolith[®] SpeedROD RP-18, de dimensões 4,6x50 mm, com sua respectiva coluna de guarda monolítica Chromolith[®] Guard Cartridge RP-18 endcapped 4,6x5 mm (resultado não demonstrado). Na utilização da C18 ACE5 foram testadas vazões entre 0,6 a 1,2 mL.min⁻¹, enquanto na segunda, as vazões contemplaram a faixa de 1 a 4,5 mL.min⁻¹. Os experimentos mostraram algumas vantagens quanto à utilização da coluna monolítica, como o aumento do tempo de retenção da NCT (cerca de 0,5 minutos) já que com a coluna particulada a NCT aparecia junto com o volume morto, além da maior faixa de trabalho para o volume da FM e a aceitabilidade de amostras impuras. Neste trabalho, a coluna monolítica foi utilizada durante um ano e meio. Em muitos testes de extrações, as amostras injetadas nem sempre apresentavam total transparência, e mesmo assim passaram pela coluna. Apesar destas terem contaminado a coluna, percebia-se que com algumas lavagens, utilizando acetonitrila, metanol e água em vazões altas, as impurezas eram retiradas com certa facilidade, o que certamente não aconteceria em uma coluna particulada. O plasma humano é uma matriz complexa que, geralmente, ao final da extração, por mais extensa que esta seja, carrega ainda resíduos de compostos proteicos e, como um dos objetivos do trabalho foi desenvolver uma extração simples e barata, acredita-se que a inserção de etapas adicionais de limpeza ou a utilização de filtros ao final da extração encareceria a metodologia. Além desses motivos, durante nosso trabalho a coluna monolítica foi a fase estacionária escolhida.

A eficiência desta coluna é similar às colunas particuladas, contudo a possibilidade de se trabalhar com vazões seis vezes maiores torna a separação significativamente mais rápida (SILVA; COLLINS; BOTTOLI, 2011). O uso da alta vazão na FM, 4 mL.min⁻¹, justifica-se

pelo aumento da eficiência da coluna e, também, pela diminuição do tempo de corrida. O grande volume de FM utilizado em cada corrida seria um fator negativo se o gradiente fosse composto de maior quantidade de solvente orgânico. Como na metodologia desenvolvida o consumo de tampão supera o consumo de solvente orgânico, cerca de 15,6 mL de tampão para 8,4 mL de solvente por corrida, avalia-se que a geração de resíduos é amenizada quanto a seu poder de toxicidade.

Uma vez que a coluna já estava selecionada, testes no método isocrático, com fase móvel composta por metanol e água deionizada (MilliQ®), foram realizados, conforme pode ser visto na Figura 7. O teste consistiu em construir quatro corridas com diferentes proporções da FM, sendo a primeira (40:60) metanol:água e as demais utilizando 50, 60 e 80% de metanol.

O grande obstáculo do projeto foi trabalhar com analitos que possuem características químicas distintas e que, por isso, requerem um manuseio cauteloso tanto na construção do método cromatográfico quanto na extração. Tanto a NCT quanto a CLZ são moléculas ionizáveis e possuem dois pK_{as} . A NCT com pK_{as} de 3,2 e 7,9 e a CLZ com pK_{as} de 3,7 e 7,6 (MOFFAT, 2005). Como os analitos possuem diferentes pK_{as} , é preferível neste caso usar tampão, uma vez que este mantém estável o grau de ionização dessas moléculas (RUELA; ARAUJO; PEREIRA, 2009). Testes com diferentes soluções tampão nas concentrações de 0,025 M foram realizados, quais sejam: tampão fosfato de potássio (pH 11,5), formiato de amônio (pH 8,5 e 10) em e acetato de sódio (pH 5) (resultado não demonstrado). Dos três tampões testados, o que proporcionou melhor separação e simetria dos picos cromatográficos foi o tampão acetato no pH 5 (Resultado não demonstrado).

Em seguida, partiu-se para um estudo das proporções das fases móveis para o gradiente. As corridas cromatográficas demonstraram que o analito NCT requer solvente com baixa força de eluição, enquanto a CLZ necessita de solvente com maior força de eluição. Várias tentativas com diferentes rampas de força de eluição e tempo foram realizadas e, então, chegou-se ao gradiente apresentado na Tabela 4, o qual apresentou tempo de corrida relativamente curto e boa separação de picos.

Os analitos envolvidos neste estudo possuem máximos de absorção em diferentes comprimentos de onda. Os comprimentos de onda para a NCT e CLZ são respectivamente, 260 e 297 nm (MOFFAT, 2005). Para minimizar a grande quantidade de dados gerados durante o trabalho, fez-se um estudo com as curvas analíticas dos padrões de cada substância nos dois comprimentos de onda supracitados. Foram avaliados cinco pontos em uma curva em

solvente nas seguintes concentrações 0,15, 0,5, 1, 5 e 10 mg.L⁻¹ para ambos os analitos. O resultado para a CLZ e NCT estão apresentados nas Figuras 8 e 9.

A robustez da coluna monolítica oferece ampla faixa de trabalho tanto para volume de injeção quanto para vazão. Para otimização do método, foram estudados cinco volumes de injeção de uma mesma amostra extraída. O objetivo foi obter o menor limite de detecção possível para o método, incrementando o volume de injeção. Foram testados volumes de 20, 30, 50, 60 e 90 µL para a matriz extraída adicionada dos padrões de PI, CLZ e NCT, os quais podem ser vistos Figura 10.

Além dos testes de volume de injeção, diferentes vazões foram avaliadas (resultado não demonstrado). Numa faixa de vazão que vai de 1,5 até 4,5 mL min⁻¹, observou-se diferença no tempo de retenção dos picos e, conseqüentemente, no tempo de corrida. Para vazões abaixo de 3 mL min⁻¹, o tempo necessário de corrida foi de 9 minutos, porém foi escolhida vazão de 4 mL min⁻¹ considerando a redução de 3 minutos no tempo de corrida final (6 minutos).

Para a escolha do padrão interno, foram testados os fármacos: carbamazepina – pureza 96% (INCQS), clonazepam – pureza 99,8% (Roche®), flunitrazepam – pureza 99,7% (Roche®), diazepam – pureza 99,7% (Roche®) e bromazepam. Os padrões internos foram separadamente adicionados a amostra de plasma na concentração de 750 µg.L⁻¹ e extraídos de acordo com a Figura 21 e injetados no HPLC de acordo com as condições do item 4.1.2.

3.2.1 Sistema Cromatográfico:

Sistema de LC/UV Shimadzu® composto de injetor automático SIL-20SA com loop de 100 µL, sistema desgaseificador DGU-20A, sistemas de bomba quaternária LC-20AT, forno CTO-20SAC, detector SPD-M20A, módulo comunicador CBM-20A e software LC solution®.

3.3 Desenvolvimento da extração

O objetivo na extração foi otimizar uma metodologia que fosse ao mesmo tempo simples, rápida e de baixo custo, considerando que os recursos alocados para a pesquisa foram escassos e o estudo em um grande número de indivíduos ficaria comprometido com custo de análise elevado. Com o intuito de selecionar o melhor solvente para a fase orgânica na

extração, experimentos de solubilidade dos analitos em hexano (Vetec[®]), clorofórmio, acetato de etila (Vetec[®]) e acetonitrila (Vetec[®]) foram realizados. O teste consistiu em dissolver 10 mg de cada analito, NCT e CLZ, em 10 mL de cada solvente. Hexano não solubilizou NCT e CLZ, enquanto acetonitrila não solubilizou o primeiro analito. Sendo assim, concluiu-se que nenhum destes dois solventes seria adequado para extração.

O hexano também pode ser utilizado ao final da extração como um possível solvente de limpeza. Isso porque, em muitas extrações que utilizam matriz biológica, é comum o aparecimento, durante a ressuspensão, de interferentes como, por exemplo, proteínas. No entanto, observou-se que a utilização dele neste experimento em volumes pequenos, juntamente com o metanol, cria uma única fase não ocorrendo, assim, a limpeza desejada.

Em seguida, foram realizadas extrações com clorofórmio e acetato de etila, como FO. Juntamente com eles, utilizou-se álcool isoamílico (Synth[®]) em pequena proporção clorofórmio ou acetato de etila:álcool isoamílico (98:2) . O álcool isoamílico é utilizado para diminuir a emulsão formada entre plasma e solvente após agitação. Para o teste, foram escolhidas três concentrações: baixa, média e alta (resultado não demonstrado). Os resultados mostraram que a extração foi semelhante para as duas FO. A primeira opção foi utilizar acetato de etila, devido ao clorofórmio ser um solvente com maior potencial tóxico. Entretanto, durante as extrações, observou-se que o acetato de etila favorecia o surgimento de emulsão entre fases, dificultando a retirada da FO e a secagem com nitrogênio. Sendo assim, o clorofórmio foi o solvente selecionado.

Para que os analitos ressuspendidos pudessem em seguida, ser injetados no cromatógrafo líquido era necessário que a solução final estivesse transparente. Soluções opacas indicam que o meio ainda contém material particulado em suspensão que podem prejudicar o sistema de alta pressão. A fim de procurar o melhor solvente pra ressuspensão dos analitos, foram realizados experimentos com tampão acetato pH 3 e 5 e tampão fosfato pH 6.1, além de metanol e acetonitrila grau HPLC 99,9% (Tédia[®]) (resultado não demonstrado). Ao final, as soluções utilizando tampão ficaram turvas, enquanto acetonitrila e metanol apresentaram soluções transparente, porém observou-se, em determinados experimentos, que acetonitrila não solubiliza NCT. Portanto, o metanol foi o solvente que apresentou melhor resultado.

A primeira tentativa de extração consistiu na seguinte metodologia: foram adicionados os analitos de interesse em 1,5 mL de plasma humano. Em seguida, 50 µL de NaOH 2 M (Cromoline[®]), e 100 mg de NaCl (Vetec[®]) foram adicionados à amostra. Após agitação, inseriu-se 5 mL do solvente de extração (clorofórmio) seguido novamente de agitação. As

fases foram separadas através de centrifugação a 4°C e 3500 rpm por 5 minutos. Em seguida, a fase orgânica (FO) foi retirada com auxílio de micropipeta e evaporada em gás nitrogênio à temperatura de 37°C. O resíduo foi ressuspensionado em 200 µL de metanol filtrado e injetado no cromatógrafo.

A inserção de NaCl mais conhecido como efeito *salting out*, faz com que as moléculas de água existentes no plasma, que antes se ligavam às proteínas, passem a ligar-se ao sal, promovendo, assim, maior interação entre proteínas e liberando maior quantidade do analito, que antes se ligava a elas. Nesse mesmo sentido, a elevação do pH na amostra faz com que as moléculas de interesse se tornem não-ionizadas, essa mudança desloca o equilíbrio para o meio orgânico, aumentando os valores de recuperação. Mudanças como a retirada do NaOH e o uso da solução tampão 25 mM de cloreto de amônio pH 8,5 e 10 e tampão fosfato pH 11,5 para alcalinização do plasma e utilização de ultrassom (Unique[®]) ao invés de mesa agitadora não surtiram melhoras nos resultados. A inserção de 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 20% (v/v) (Vetec[®]), após adição do plasma, para precipitação de proteínas apresentou melhoras na extração, mas, ainda sim, muitas das extrações eram perdidas devido a turvações na ressuspensão. O cromatograma da extração descrita acima está apresentado na Figura 15.

Outros métodos de extração começaram a ser testados, dentre eles o método utilizando acetonitrila para precipitação de proteínas. Todavia, essa metodologia foi descartada por causa da não solubilização da NCT neste solvente. O cromatograma da extração descrita acima está apresentado na Figura 16.

Um terceiro método de extração testado (WOHLFARTH et al., 2011) consistiu em adicionar os analitos ao plasma, mais 1 mL de carbonato de sódio (100g.L⁻¹, pH 11) e 1,5 mL de acetato de etila, seguida de centrifugação. Logo após, o sobrenadante (FO) foi retirado do tubo falcon e secado em nitrogênio, ressuspensionado em metanol para injeção. O cromatograma da extração descrita acima está apresentado na Figura 17.

A extração em SPE também foi realizada. A fase sólida utilizada foi Stracta X-C com dimensões de 60 mg/3 mL. Primeiramente, a coluna de extração foi condicionada com 1 mL de acetonitrila e equilibrada com 1 mL de acetato de sódio 100 mM pH 5.6. A amostra adicionada dos analitos foi introduzida na coluna, seguida da primeira lavagem com 1 mL acetato de sódio novamente, e, a segunda lavagem, com 1 mL de metanol. A secagem da coluna foi realizada com vácuo por 5 minutos e a eluição se deu com 1 mL de hidróxido de amônio:acetonitrila (5:95). Logo após, a FO foi evaporada em nitrogênio e ressuspensionada em 200 µL de metanol. O cromatograma da extração descrita acima está apresentado na Figura 18.

A próxima extração foi realizada por partição em baixa temperatura, sendo que na primeira foi utilizado-se somente acetonitrila, a segunda usou-se proporção de (93,75:6,25) acetonitrila:metanol e a terceira, com (81,25:18,75) de acetonitrila:acetato de etila. Iniciou-se com a adição dos analitos no plasma mais o solvente nas condições acima citadas. Agitação utilizando vórtex seguido de ultrassom por 5 minutos e centrifugação 4500 rpm a 10 minutos. Após isso, os tubos foram levados ao congelador e congelados por 6 horas, a fim de facilitar a separação das fases. Após este tempo, filtrou-se a fase orgânica em membrana de 45 µm e o filtrado foi evaporado à secura em fluxo de nitrogênio e ressuspendido em 200 µL de metanol. O cromatograma da extração descrita acima está apresentado na Figura 19.

No sétimo e último método de extração testado, adaptado de (LINDA, 1983), os analitos são adicionados ao plasma mais 0,1 mL de sulfato de zinco heptahidratado 20% (p/v), seguido de agitação em vórtex e 5 minutos de repouso. Em seguida, adicionou-se 0,2 mL de solução saturada de hidróxido de cálcio, realizou-se uma filtração seguida de agitação em vórtex e mais 5 minutos de repouso. Logo, transferiu-se 2 mL de clorofórmio seguido de agitação em vórtex e centrifugação a 4500 rpm durante 10 minutos. A FO foi separada e evaporada à secura em nitrogênio, em seguida ressuspendida em 200 µL de metanol.

De todas as extrações testadas, esta foi a que mostrou melhor resultado. No entanto, foi necessário otimizá-la, com a inserção de HCl, para que esta extração pudesse apresentar melhores resultados. O HCl serviu para impedir que a NCT se volatilizasse enquanto a FO estivesse sendo seca em N₂, melhorando, desta forma, a determinação da concentração de nicotina (NAKAJIMA, 2000). O cromatograma da extração descrita acima está apresentado na Figura 20.

3.4 Validação

Os dados apresentados nesta dissertação para a validação do método analítico foram obtidos no Laboratório de Toxicologia da Universidade de Brasília, contemplando os parâmetros descritos anteriormente. O método de validação proposto seguiu, em parte, a resolução da ANVISA (BRASIL, 2012), que normatiza a validação de métodos bioanalíticos. O uso desta resolução é obrigatório somente para registro e pós-registro de medicamentos, não sendo este o objeto do estudo, justifica-se, portanto, a utilização somente de parte desta resolução.

O metabólito N-desmetilclozapina não pôde ser quantificado nos ensaios de validação, devido a picos desconhecidos, no mesmo tempo de retenção do analito que foram observados em várias corridas durante os ensaios de linearidade, precisão e exatidão. Esse fator impossibilitou que tal metabólito fosse quantificado. Embora, após cada sequência de injeções de determinada concentração fosse inserida uma injeção de solvente metanol para a detecção de efeito residual, em todas as corridas de metanol realizadas não se observou picos residuais. O aparecimento destes picos desconhecidos pode ter sua origem na extração, apesar do fato não ter ocorrido em todas elas. Outra hipótese pode ser um possível efeito de matriz, porém não se observou o aumento deste pico à medida que a concentração do analito aumentava.

3.4.1 Seletividade

O método consistiu em extrair uma alíquota de amostra branco e compará-la com uma amostra processada no LIQ. O método de extração seguiu o esquema apresentado na Figura 21 e no item 4.1.2 De acordo com a resolução da ANVISA nenhum pico interferente no tempo de retenção dos analitos pode ser maior que 20% do LIQ.

3.4.2 Linearidade

O parâmetro linearidade foi avaliado por meio de curvas de calibração. As amostras foram inicialmente adicionadas do padrão do analito e do PI e depois submetidas ao processo de extração indicado na Figura 21 e analisados em HPLC de acordo com o item 4.1.2. As curvas foram construídas com seis concentrações para NCT e CLZ, na faixa de 1500 a 5250 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 100 a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. As curvas foram ajustadas pelo método dos mínimos quadrados utilizando o programa OriginPro 8.6. A Curva de calibração foi construída traçando-se a média das áreas dos picos versus sua concentração. As curvas foram analisadas com e sem a utilização de PI.

3.4.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Para estes parâmetros apresentados, a resolução da ANVISA (BRASIL, 2012) não menciona nenhum método a ser aplicado, contudo, a resolução anterior da ANVISA de nº 899 de 29 de maio de 2003 estabelece para o LIQ a utilização da razão de 5:1 entre o sinal e o ruído da linha de base. Já para o LD, a resolução recomenda a razão de 2 ou 3:1. Outra fonte recomenda para a determinação do LIQ e LD, a utilização da relação sinal:ruído 10:1 e 3:1, respectivamente (RIBANI et al., 2004). Neste trabalho foi aplicada a relação sinal:ruído de 10:1 para determinação do LIQ, devido ao favorecimento na integralização dos picos dos analitos nas amostras biológicas. Para isso, compararam-se os sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas das substâncias de interesse com um branco destas amostras extraídas de acordo com a Figura 21 e analisados pela metodologia indicada no item 4.1.2.

3.4.4 Precisão e Exatidão

Os valores de precisão foram obtidos dividindo o desvio padrão (DP) das replicatas pela média das mesmas multiplicando os resultados por 100. Para a recuperação utilizou-se a média das replicatas menos a concentração teórica esperada, dividida novamente pela concentração teórica. O resultado final é multiplicado por 100.

Para a determinação da precisão e recuperação (exatidão) do método foram realizadas 5 replicatas em plasma extraído com adição de 4 concentrações diferentes, o que resulta num total de 20 injeções. As amostras foram extraídas de acordo com a Figura 21 e analisadas pela metodologia indicada no item 4.1.2.

3.4.5 Estabilidade

Para o estudo de estabilidade foram empregadas três amostras de CQB e CQA. Foram empregadas apenas amostras cujo resultado da análise, imediatamente após sua preparação, esteve dentro de $\pm 15\%$ do valor nominal. A estabilidade foi avaliada em curta duração, ou seja, os analitos foram adicionados a matriz e só foram processadas e analisadas após permanecerem a temperatura ambiente por tempo superior ao que as amostras em estudos

foram mantidas durante o trabalho, cerca de 4h. A extração das amostras foi realizada de acordo com a Figura 21 juntamente com a metodologia indicada no item 4.1.2.

3.4.6 Efeito de Matriz

Este ensaio foi realizado com amostras de plasma processadas de acordo com a Figura 21, posteriormente adicionadas de analito e PI, e soluções, nas mesmas concentrações das amostras CQB e CQA. As amostras foram analisadas pela metodologia indicada no item 4.1.2.

3.4.7 Efeito Residual

Para o efeito residual foram realizadas 3 injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma amostra processada no LSQ. As respostas de picos interferentes devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas no LIQ.

4 Resultados e Discussão

4.1 Metodologia em HPLC

Para o teste isocrático obteve-se o cromatograma abaixo:

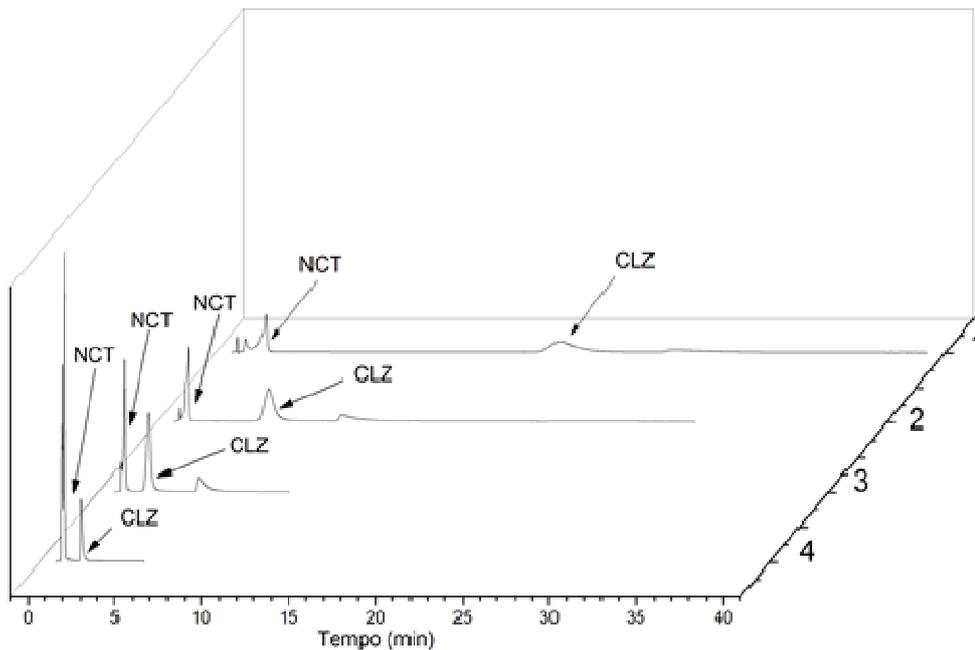


Figura 7: Cromatogramas de testes isocráticos utilizando metanol e água deionizada como FM. 1) 40%, 2) 50%, 3) 60% e 4) 80% Metanol.

Utilizou-se a absorbância no eixo y para construção do cromatograma acima. NCT e CLZ foram injetadas. A corrida número 1 com 40% de metanol na FM mostra alargamento de picos e tempo de 40 min. À medida que a porcentagem de solvente aumenta, percebe-se diminuição significativa do tempo e melhor simetria de picos, no entanto os picos dos analitos, corrida de número 4, se unem e a separação fica comprometida. Um segundo ponto, seria a baixa polaridade da molécula de NCT, que exige cuidado na mudança da polaridade da fase móvel, especialmente quando se utiliza colunas do tipo C18 de fase reversa. Sendo assim, o método de eluição isocrático pode não ser eficiente para quantificação de NCT e CLZ.

O resultado do teste utilizando diferentes comprimentos de onda é apresentado abaixo:

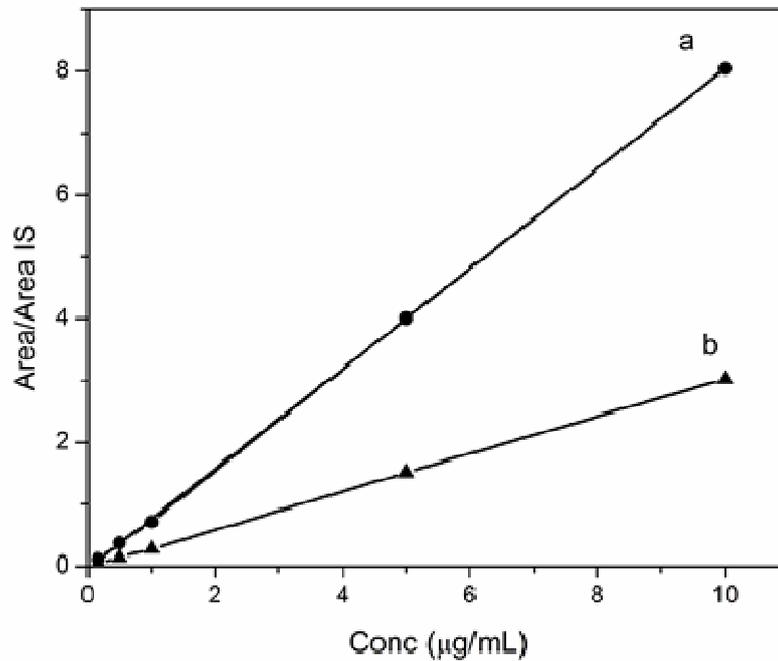


Figura 8: Curvas Analíticas da CLZ em diferentes comprimentos de onda. a) 260 nm, b) 297 nm.

De acordo com o resultado mostrado na Figura 8, conclui-se que, entre os dois comprimentos de onda, o de 260 nm foi o que apresentou a maior inclinação da reta para a CLZ e foi utilizado para experimentos posteriores. A NCT não foi detectada no comprimento de onda de 297 nm e foi estudada em 260 nm, conforme sugerido por MOFFAT (2005). Sua curva de calibração em saolvente está apresentada na Figura 9. A amostra de plasma extraído também apresentou melhor linha de base utilizando 260 nm ao invés de 297 nm, que apresentou interferentes.

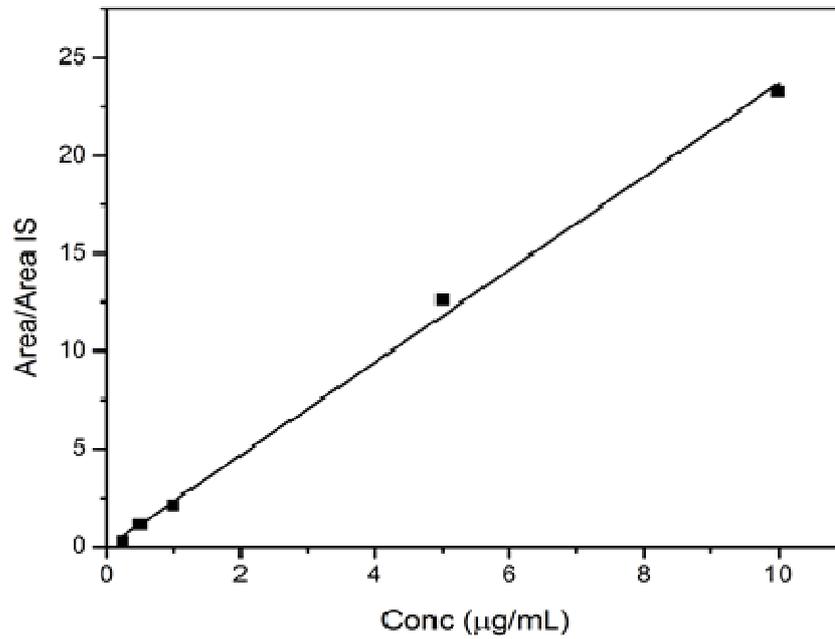


Figura 9: Curva Analítica da NCT no comprimento de onda de 260 nm.

O próximo teste está relacionada a volume de injeção e o resultado está demonstrado nos cromatogramas abaixo.

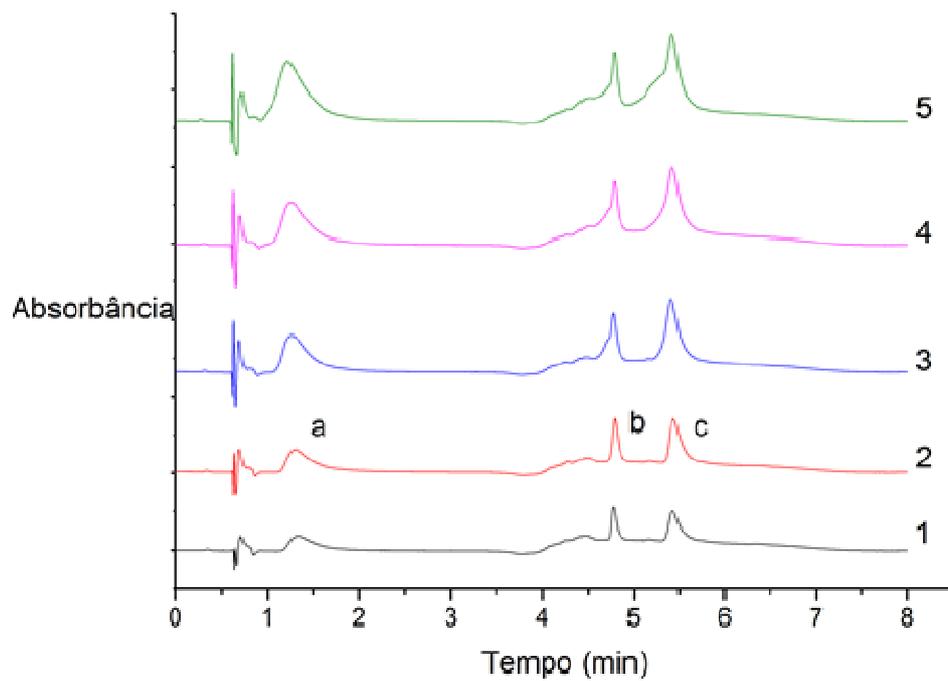


Figura 10: Estudo dos volumes de injeção. 1)20, 2)30, 3)50, 4)60 e 5)90 µL. NCT (a), PI (b) e CLZ (c).

Utilizou-se a absorvância no eixo y para construção do cromatograma acima. Para selecionar o volume de injeção de trabalho, avaliou-se visualmente a simetria dos picos. De acordo com a Figura 10, o volume de 30 μ L foi avaliado como melhor volume de injeção.

No teste para selecionar o PI adequado, tanto o clonazepam como o flunitrazepam e o diazepam teve tempo de retenção muito próximo ao da CLZ, o que poderia interferir na seletividade deste analito. Apenas a carbamazepina e o bromazepam eluíram com tempos de retenção diferentes da NCT e CLZ. A carbamazepina com um tempo de retenção médio de 2,58 minutos e o bromazepam com 2,15 minutos. Dentre as duas substâncias, optou-se por trabalhar com o bromazepam, por apresentar melhor simetria no pico.

4.1.1 Fase móvel:

Após múltiplos testes para se encontrar as melhores proporções para o tampão e solventes, atingiram-se as condições ótimas apresentadas abaixo:

Tabela 4: Gradiente de eluição desenvolvido para determinação de NCT, CLZ e N-CLZ.

Tempo (Min)	Tampão (%)	Metanol (%)	Acetonitrila (%)
0	95	0	5
0,5	95	0	5
1,0	65	10	25
4,0	45	40	15
5,0	80	10	10
5,6	95	0	5
6,0	95	0	5

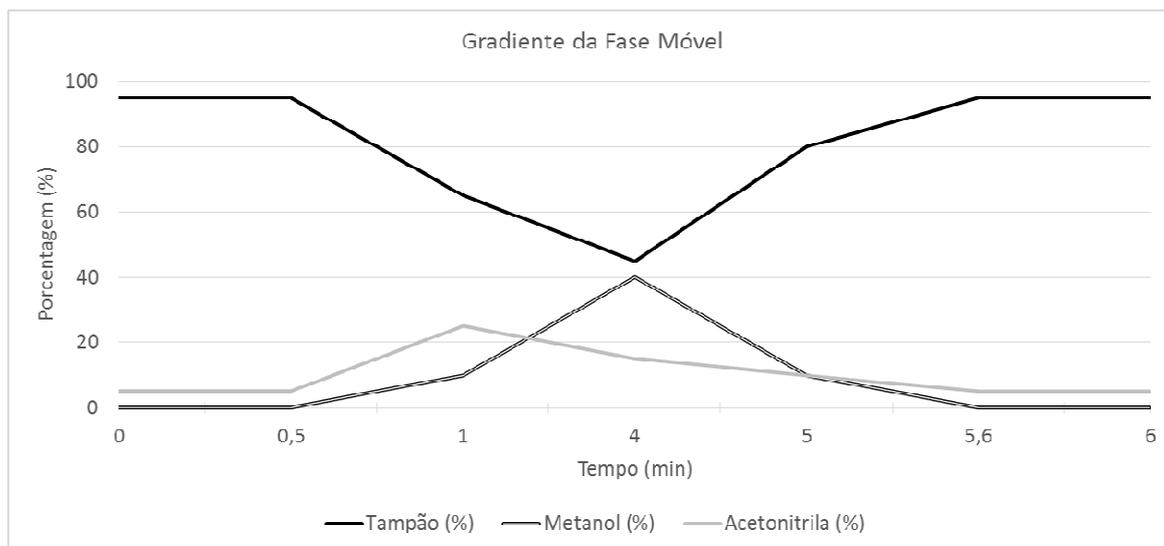


Figura 11 – Esquema de gradiente de eluição utilizado para a determinação de NCT, CLZ e N-CLZ

A fase móvel consistiu de tampão acetato de sódio 25 mM pH 5, metanol e acetonitrila. Nos primeiros 0,5 minutos a proporção de solvente inicia com (95:0:5), respectivamente. No primeiro minuto a proporção segue com diminuição do tampão para 65%, enquanto os dois seguintes solventes aumentam para 10 e 25%, chegando aos 4 minutos com proporção de (45:40:15), respectivamente. Em cinco minutos a porcentagem de tampão volta a aumentar para 80%, enquanto ao outros dois solventes apolares diminuem para 10%. Em 5,6 minutos a proporção volta ao seu estado inicial permanecendo até o final da corrida, 6 minutos.

4.1.2 Condições Cromatográficas

As condições finais cromatográficas, após otimização, têm os parâmetros resumidos a seguir:

- Sistema: gradiente
- Fase móvel (tabela 4)
- Fluxo: 4 mL.min⁻¹
- Comprimento de onda: 260 nm
- Tempo de corrida: 6 min
- Volume de injeção: 30 µL

4.2 Amostra

Para o desenvolvimento e validação da metodologia proposta foi utilizado plasma humano como matriz biológica. As bolsas de plasma humano foram doadas pela Fundação Hemocentro de Brasília. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C . Antes das análises, as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente.

4.2.1 Avaliação do perfil cromatográfico das amostras

O plasma é considerado branco quando não estão presentes nele os analitos de interesse e o padrão interno. Este apresenta apenas interferentes endógenos da matriz.

Para este estudo, duas bolsas de plasma humano com cerca de 250 mL foram cedidas pela Fundação Hemocentro de Brasília (FHB). Elas são de doadores voluntários desconhecidos, portanto informações sobre a utilização de qualquer substância por eles não foram repassadas. Uma alíquota de cada amostra de plasma foi extraída de acordo com a Figura 21 e injetada em HPLC utilizando a metodologia estabelecida no item 4.1.2. As Figuras 12 e 13 mostram os cromatogramas obtidos pela injeção de cada uma dessas bolsas de plasma, após o mesmo procedimento de extração.

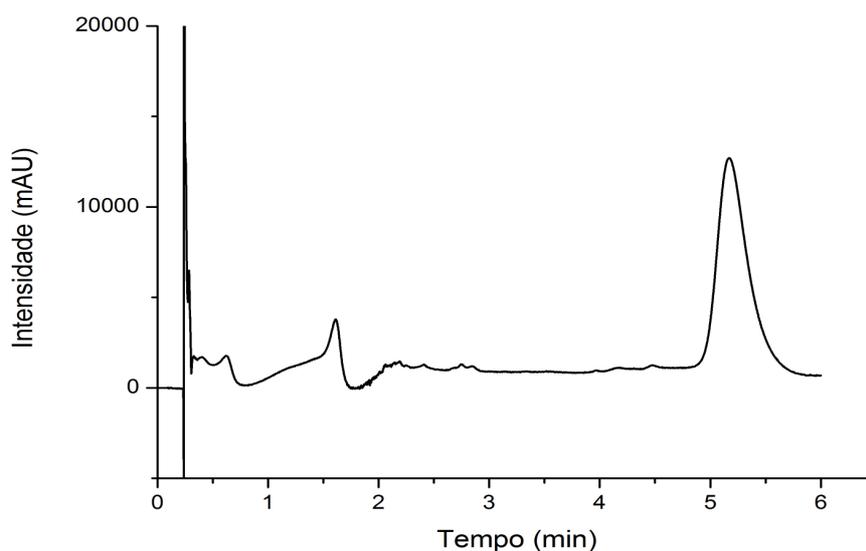


Figura 12: Cromatograma de amostra branco (bolsa 1). Condições: Sistema em gradiente de acordo com a Tabela 4, coluna monolítica de fase reversa Chromolith® SpeedROD RP-18 4,6x50mm 2 μm , fluxo 4mL.min⁻¹, comprimento de onda estudado 260nm, temperatura de trabalho 25 $^{\circ}\text{C}$, tempo de corrida de 6 min e volume de injeção de 30 μL .

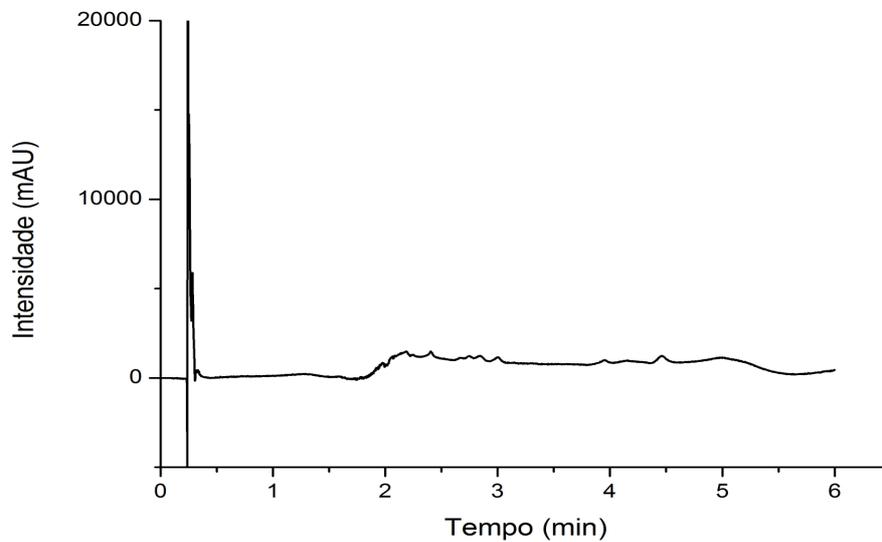


Figura 13: Cromatograma de amostra branco (bolsa 2). Sistema em gradiente de acordo com a Tabela 4, coluna monolítica de fase reversa Chromolith® SpeedROD RP-18 4,6x50 mm 2 μm , fluxo 4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, comprimento de onda estudado 260 nm, temperatura de trabalho 25°C, tempo de corrida de 6 min e volume de injeção de 30 μL .

No intuito de investigar o perfil destes plasmas, testou-se uma amostra de 10 mL de plasma branco cedido voluntariamente por uma aluna colaboradora do Laboratório de Toxicologia. A doadora informou não ter utilizado qualquer medicamento ou qualquer outro tipo de substância nos últimos seis meses antecedentes à coleta. O cromatograma da aluna doadora é apresentado na Figura 14.

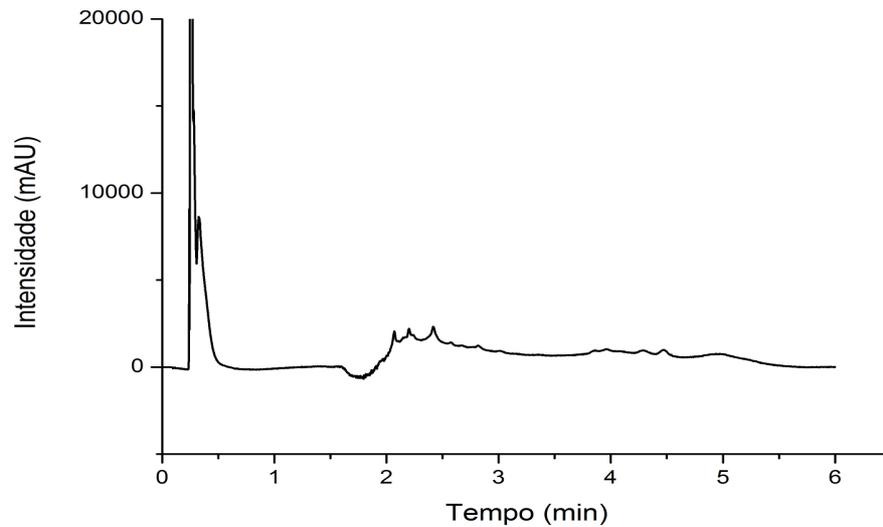


Figura 14: Cromatograma de amostra branco (plasma de aluna do LabTox). Sistema em gradiente de acordo com a Tabela 4, coluna monolítica de fase reversa Chromolith® SpeedROD RP-18 4,6x50 mm 2 μm , fluxo 4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, comprimento de onda estudado 260 nm, temperatura de trabalho 25°C, tempo de corrida de 6 min e volume de injeção de 30 μL .

Ao analisar os três cromatogramas acima, pode-se observar que uma das bolsas de plasma humano cedidas pela FHB possui perfil cromatográfico com comportamento diferente dos dois outros em estudo. As interferências causadas nesta amostra não podem ser esclarecidas, já que maiores informações da amostra são desconhecidas. Sendo assim, justificasse a utilização de apenas uma das bolsas de plasma humano cedidas pela FHB, e não de um *pool* de plasma, como geralmente é usado em pesquisas.

4.3 Avaliação dos testes de extração

A primeira extração utilizando TCA 20% apresentou o seguinte resultado:

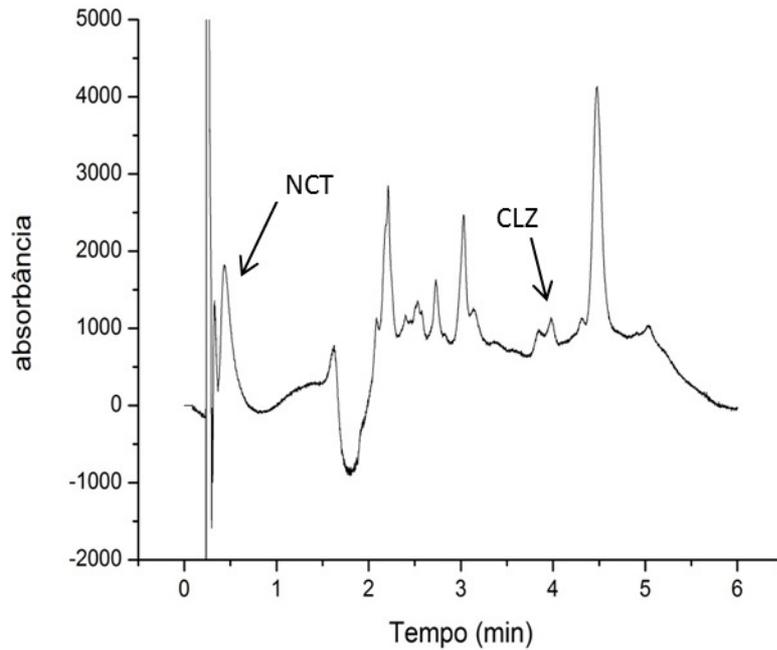


Figura 15: Cromatograma da extração em plasma utilizando TCA 20%. Sistema em gradiente de acordo com a Tabela 4, coluna monolítica de fase reversa Chromolith® SpeedROD RP-18 4,6x50 mm 2 μm , fluxo 4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, comprimento de onda estudado 260 nm, temperatura de trabalho 25°C, tempo de corrida de 6 min e volume de injeção de 30 μL .

O cromatograma acima apresenta o pico de nicotina muito próximo ao volume morto, prejudicando sua integração e quantificação. A segunda extração utilizando acetonitrila como solvente de precipitação de proteínas está apresentada abaixo:

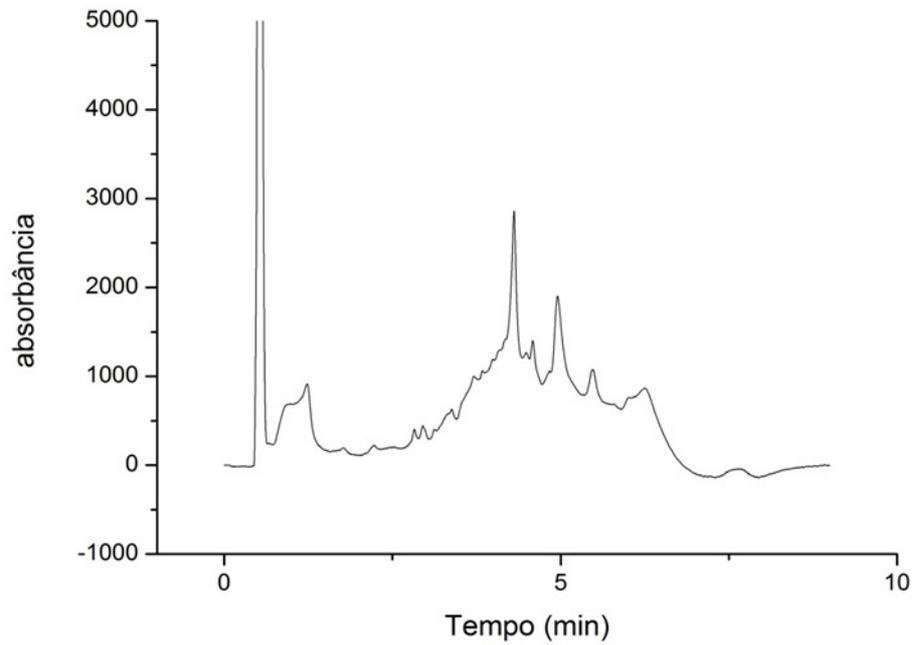


Figura 16: Cromatograma da extração em plasma utilizando Acetonitrila. Sistema em gradiente de acordo com a Tabela 4, coluna monolítica de fase reversa Chromolith® SpeedROD RP-18 4,6x50 mm 2 μm , fluxo 4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, comprimento de onda estudado 260 nm, temperatura de trabalho 25°C, tempo de corrida de 6 min e volume de injeção de 30 μL .

O cromatograma acima apresenta interferentes no tempo de retenção da CLZ encobrindo seu pico. A NCT não foi extraída.

O cromatograma abaixo apresenta o pico da NCT coeludindo com o volume morto.

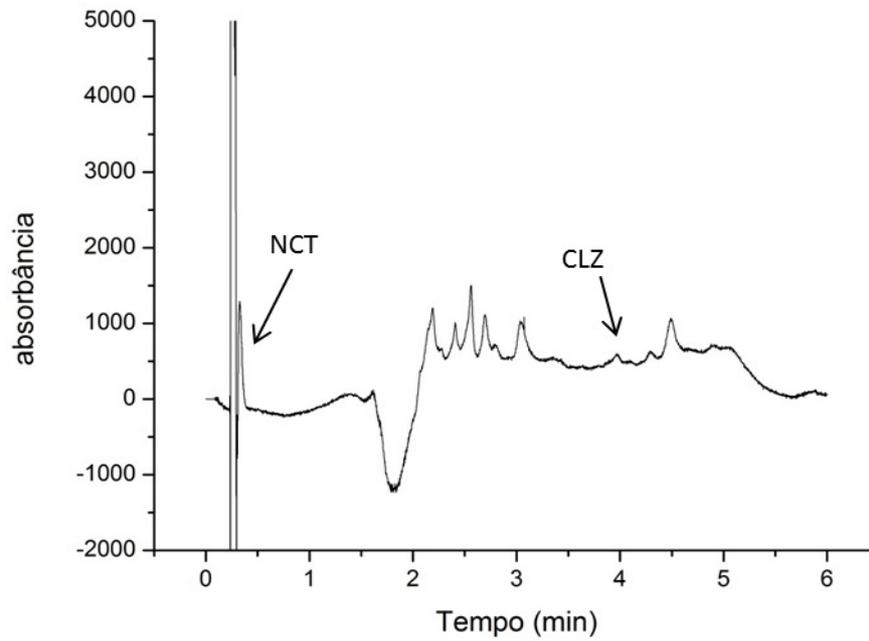


Figura 17: Cromatograma da extração em plasma utilizando metodologia Wohlfarth 2011. Sistema em gradiente de acordo com a Tabela 4, coluna monolítica de fase reversa Chromolith® SpeedROD RP-18 4,6x50 mm 2 μm , fluxo 4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, comprimento de onda estudado 260 nm, temperatura de trabalho 25°C, tempo de corrida de 6 min e volume de injeção de 30 μL .

O resultado da extração em fase sólida, Figura 18, não demonstrou nenhum dos analitos, sugerindo que a metodologia preconizada pelo fabricante do cartucho não é eficaz para esta combinação de analitos.

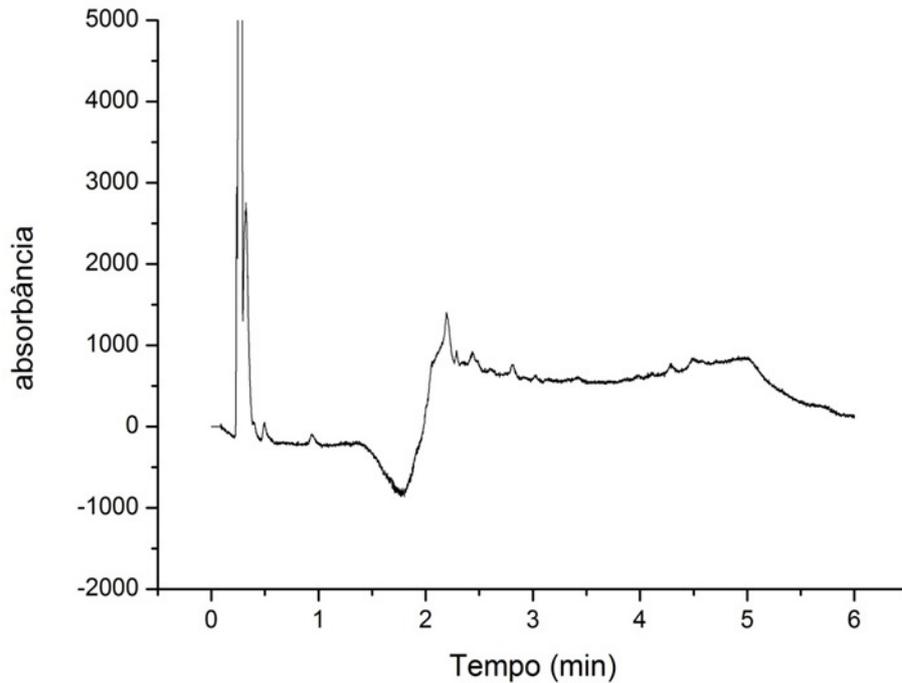


Figura 18: Cromatograma da extração em plasma utilizando metodologia SPE. Sistema em gradiente de acordo com a Tabela 4, coluna monolítica de fase reversa Chromolith® SpeedROD RP-18 4,6x50 mm 2 μm , fluxo 4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, comprimento de onda estudado 260 nm, temperatura de trabalho 25°C, tempo de corrida de 6 min e volume de injeção de 30 μL .

Após a injeção em HPLC, utilizando a extração descrita por França (2013), não se observou nenhum dos analitos de interesse no cromatograma apresentado na Figura 19. Esta extração é mais uma evidencia de que a acetonitrila não é o solvente adequado para a extração dos analitos NCT e CLZ, além de arrastar grande quantidade de interferentes na amostra de injeção.

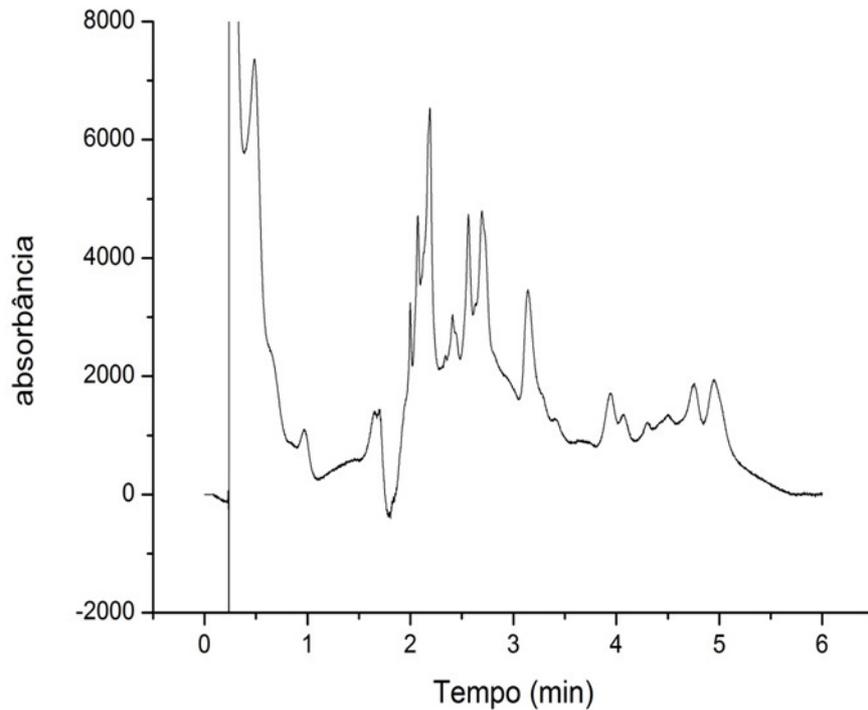


Figura 19: Cromatograma da extração em plasma utilizando metodologia França 2013. Sistema em gradiente de acordo com a Tabela 4, coluna monolítica de fase reversa Chromolith® SpeedROD RP-18 4,6x50 mm 2 μm , fluxo 4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, comprimento de onda estudado 260 nm, temperatura de trabalho 25°C, tempo de corrida de 6 min e volume de injeção de 30 μL .

A ultima extração testada neste trabalho, foi a que apresentou o melhor resultado tanto na extração da NCT como na CLZ. Após otimização com HCl o resultado para NCT foi positivo. O resultado está apresentado na Figura 20.

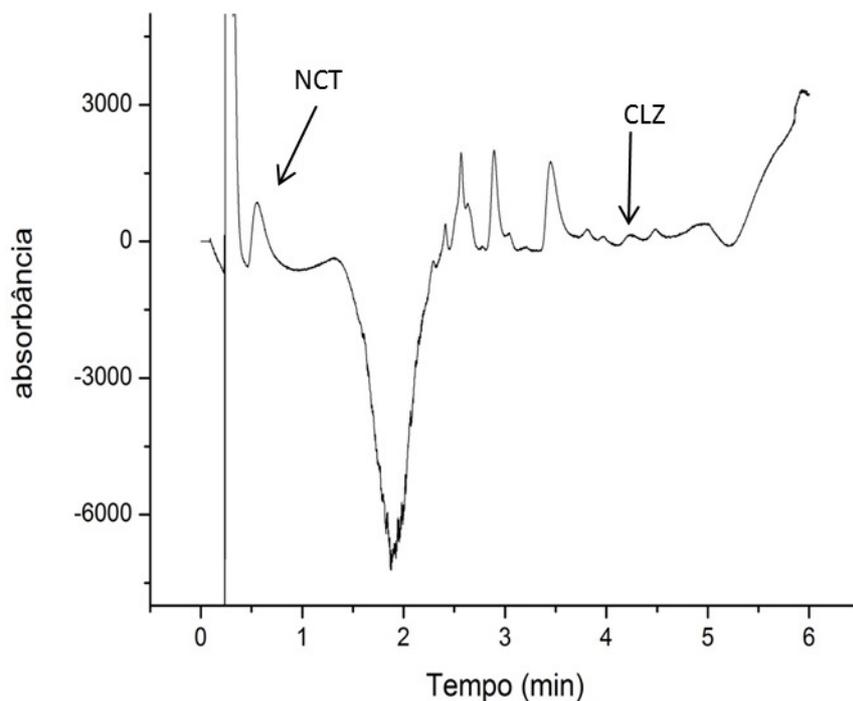


Figura 20: Cromatograma da extração em plasma utilizando metodologia Linda 1983. Sistema em gradiente de acordo com a Tabela 4, coluna monolítica de fase reversa Chromolith® SpeedROD RP-18 4,6x50 mm 2 μ m, fluxo 4 mL.min⁻¹, comprimento de onda estudado 260 nm, temperatura de trabalho 25°C, tempo de corrida de 6 min e volume de injeção de 30 μ L.

A extração descrita por Linda (1983) seguida de otimização foi a metodologia escolhida para este trabalho. Ainda sim o aparecimento de interferentes nesta extração prejudicou a integração e quantificação do metabólito da CLZ. Contudo, esta metodologia apresentou maior eficiência de extrações no resultado final, ou seja, na ressuspensão da amostra. Este foi o fator excludente evidenciado na metodologia utilizando TCA 20%. A seguir segue a descrição completa da extração utilizada neste trabalho.

O plasma branco foi dividido em alíquotas de 1 mL, em tubos falcon de 50 mL. O tubo de 50 mL foi utilizado por facilitar a remoção da fase orgânica. Cada alíquota foi adiconada com solução de trabalho contendo as três substâncias em estudo, mais solução de

padrão interno. Foram adicionados 100 μL de solução de sulfato de zinco hepta-hidratado a 20% (m/v) (Vetec[®]), seguido por vórtex (Phoenix[®]) e descanso de 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 200 μL de solução de hidróxido de cálcio saturado (Vetec[®]), seguido por vórtex e descanso de 5 minutos e a mistura foi extraída com 2 mL de clorofórmio (Vetec[®]), uma única vez. O clorofórmio foi separado por centrifugação a 4°C e 4500 rpm durante 10 minutos em Centrifuga modelo rotina 380P (Hettich[®]) e transferido manualmente com micropipeta para dentro de um vial de 2 mL contendo 15 μL de ácido clorídrico (Vetec[®]). A fase orgânica foi rapidamente evaporada até a secura em evaporador de fluxo de nitrogênio (Marconi[®]) a 37°C e 200 μL de metanol foram utilizados na ressuspensão. A solução foi transferida para um *insert* de 200 μL e 30 μL foram injetados no sistema de LC/UV. Conforme verificado, o esquema da extração está representado pela Figura 21.

4.3.1 Preparação das Amostras

O preparo da amostra pode ser visualizado na Figura 21:

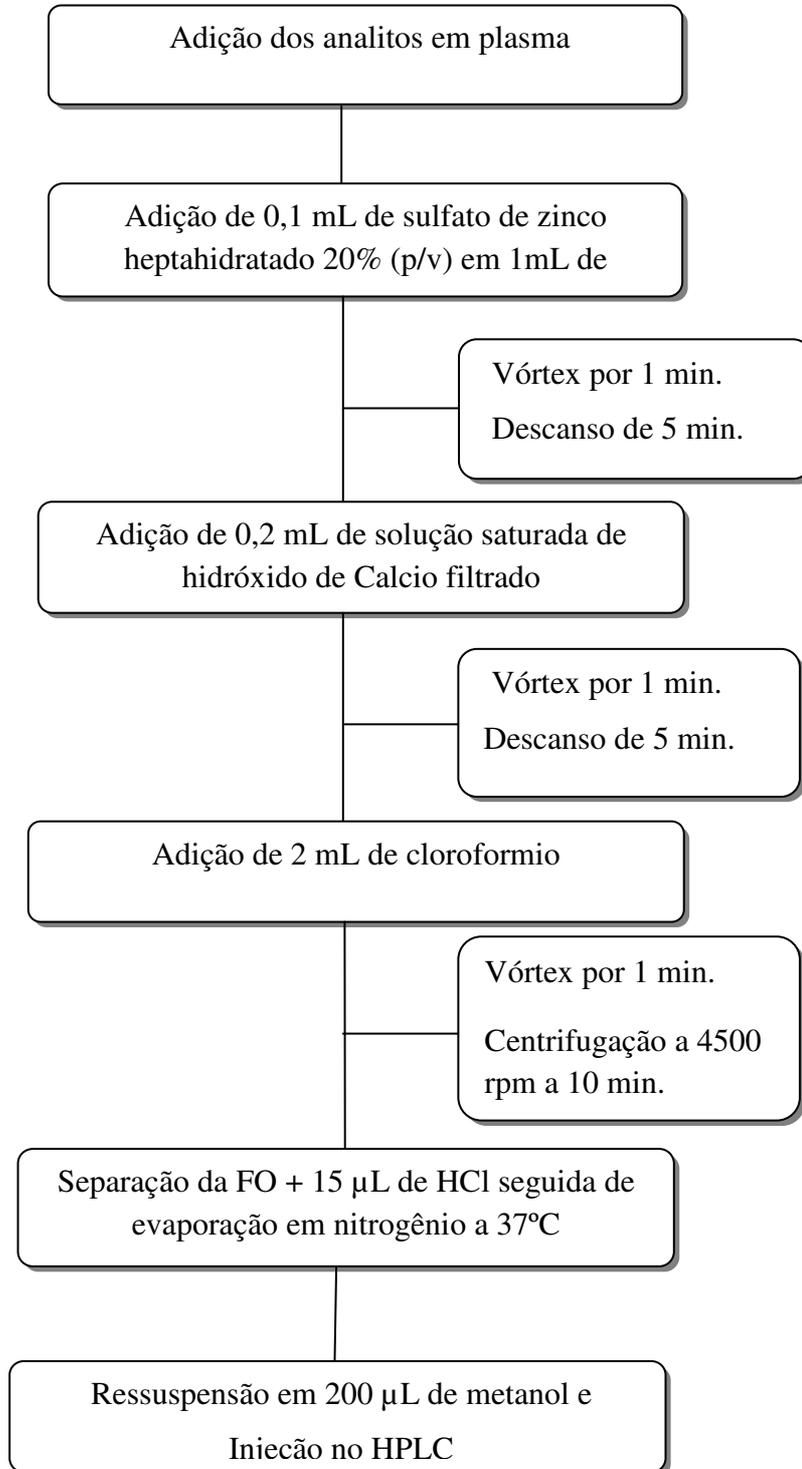


Figura 21: Esquema da extração

4.4 Validação

4.4.1 Seletividade

Para a validação do método analítico foi realizado o ensaio de seletividade, que garante que a resposta do equipamento seja exclusivamente da substância de interesse (Fig. 22).

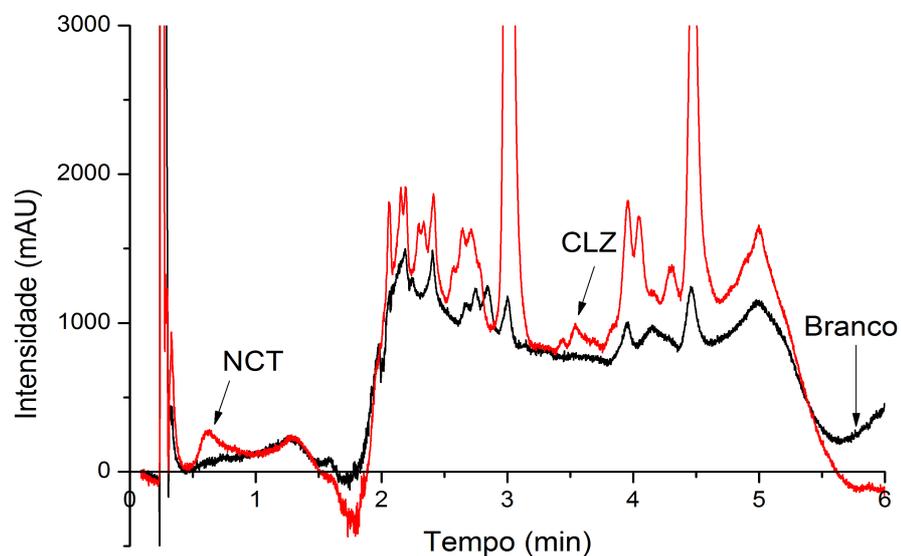


Figura 22: Cromatograma de amostra extraída no limite de quantificação. a) NCT e CLZ. Sistema em gradiente de acordo com a Tabela 4, coluna monolítica de fase reversa Chromolith® SpeedROD RP-18 4,6x50 mm 2 μ m, fluxo 4 mL.min⁻¹, comprimento de onda estudado 260 nm, temperatura de trabalho 25°C, tempo de corrida de 6 min e volume de injeção de 30 μ L.

Nenhum pico interferente no tempo de retenção dos analitos NCT e CLZ maior que 20% do LIQ foram detectados. Conforme pode ser visto na Figura 22, o método proposto é seletivo. Concentrações no LIQ: NCT (1500 μ g.L⁻¹) e CLZ (100 μ g.L⁻¹).

4.4.2 Linearidade

O parâmetro linearidade foi avaliado por meio de curvas de calibração. As curvas foram estudadas com e sem a utilização do padrão interno. As Figuras 23 e 24 mostram os gráficos das curvas de calibração para NCT e CLZ.

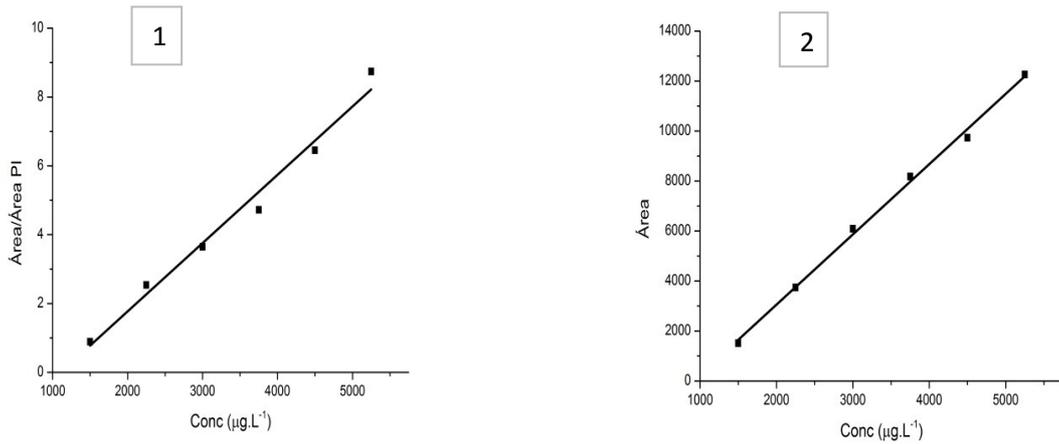


Figura 23: Curvas de calibração. 1)NCT com PI e 2)NCT sem PI. Sistema em gradiente de acordo com a Tabela 4, coluna monolítica de fase reversa Chromolith® SpeedROD RP-18 4,6x50 mm 2 μm , fluxo 4 mL.min^{-1} , comprimento de onda estudado 260 nm, temperatura de trabalho 25°C, tempo de corrida de 6 min e volume de injeção de 30 μL .

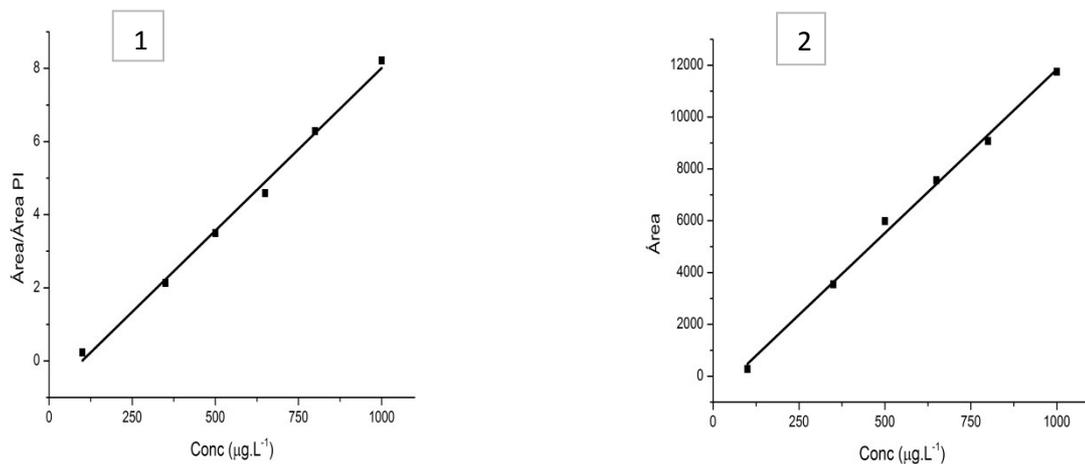


Figura 24: Curvas de calibração. 1) CLZ com PI e 2)CLZ sem PI. Sistema em gradiente de acordo com a Tabela 4, coluna monolítica de fase reversa Chromolith® SpeedROD RP-18 4,6x50 mm 2 μm , fluxo 4 mL.min^{-1} , comprimento de onda estudado 260 nm, temperatura de trabalho 25°C, tempo de corrida de 6 min e volume de injeção de 30 μL .

Os resultados obtidos na determinação da curva de calibração, empregando o método por CLAE, podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5: Regressão Linear dos dados na determinação simultânea de NCT e CLZ.

Substâncias	Parâmetros Estatísticos	
	Equação da reta	Coefficiente (r)
Nicotina com PI	$y = 0,002x - 2,196$	0,99089
Nicotina sem PI	$y = 2,811x - 2565,195$	0,99844
Clozapina com PI	$y = 0,009x - 0,879$	0,9975
Clozapina sem PI	$y = 12,621x - 783,808$	0,99792

As curvas foram analisadas com e sem a utilização de PI, como pode ser visto nas Figuras 23 e 24. Ambas as curvas demonstraram resposta adequada do cromatógrafo em relação às concentrações conhecidas das amostras injetadas.

4.4.3 Limite de detecção e limite de quantificação

A relação sinal/ruído estabeleceu uma concentração mínima, na qual a substância pode ser facilmente detectada e quantificada.

Tabela 6: Limite de detecção e quantificação do método utilizando sinal: ruído.

Substâncias	Área do ruído detectada	3x sinal	10x sinal	LD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LIQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
NCT	93	279	930	1000	1500
CLZ	81	243	810	70	100

Por existirem vários conceitos que circundam a determinação do limite de detecção, este, por muitas vezes, torna-se uma questão complexa. No intuito de minimizar as dúvidas, calculou-se o LD por um segundo método, utilizando os parâmetros da curva. Abaixo segue a fórmula utilizada e a tabela com os valores obtidos:

LD: ((Coeficiente linear da equação) + 3x (desvio padrão do coeficiente linear))/(coeficiente angular da equação)

Tabela 7: Limite de detecção e quantificação do método utilizando os parâmetros da curva de calibração.

Substâncias	LD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LIQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
NCT	1050	1300
CLZ	110	140

Geralmente, o método sinal-ruído é o mais empregado nas técnicas analíticas (RIBANI et al, 2004). No entanto, este método aplicado em análises cromatográficas pode criar dúvidas devido a curva analítica ser construída através da área dos analitos e não apenas pelo sinal do detector. Para técnicas cromatográficas, o método que produz maior confiabilidade é o baseado em parâmetros da curva de calibração, por considerar tanto o tipo quanto o tempo de uso da coluna.

Os valores obtidos nos dois métodos utilizados para quantificar o LD e o LIQ apresentaram valores próximos. Os valores apresentados na Tabela 6 foram os valores utilizados para determinação do LD e do LIQ neste trabalho.

Para a NCT, as concentrações plasmáticas no sangue arterial situam-se entre 20 e 60 ng.mL^{-1} após o uso de um cigarro, sendo que após a primeira tragada, as concentrações plasmáticas podem chegar a 7 ng.mL^{-1} (LUNELL et al., 2000). Apesar da NCT ser vista como um interferente em nosso trabalho, utilizá-la em pequenas quantidades, abaixo de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, seria o ideal. No entanto, devido a sua alta polaridade, a NCT apresenta baixa retenção em colunas do tipo C18 de fase reversa afetando a sua sensibilidade ao método proposto. Por isso, concentrações abaixo de 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ não podem ser detectadas nesta metodologia, o que fez com que o LIQ fosse de 1500 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Quanto a CLZ, Edno e colaboradores (1997) relatam concentrações plasmáticas de 79 a 623 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em onze pacientes que receberam doses de CLZ entre 150 a 600 mg por dia. Em uma segunda determinação deste fármaco, Shen e colaboradores (2002) encontraram uma concentração plasmática de 337,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Sendo assim, os limites de detecção e quantificação juntamente com as concentrações da curva de calibração estabelecidas neste trabalho estão dentro dos valores encontrados na literatura.

4.4.4 Precisão e Exatidão

Muitas das replicatas não se obteve extração dos analitos e muitos pontos necessitaram ser retirados. A justificativa para a variação do número de replicatas está no fato dos picos dos analitos não terem sido identificados nos cromatogramas em variados pontos de extração. Uma possível hipótese para isto está no processo de extração, que, apesar de ter sido realizada pela mesma analista e ter seguido rigorosamente a metodologia proposta, ao ser realizado em grande quantidade não apresentou a extração de 100% dos pontos. Um segundo motivo é que, pela mesma causa supracitada, alguns picos do PI também não foram extraídos; sendo assim, os cálculos que utilizam a relação área/área do PI também necessitaram ser retirados. A quantidade de replicatas utilizada para prever a precisão e a exatidão está inserida nas tabelas abaixo, bem como a média e o desvio padrão (DP) das concentrações. Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 8, 9, 10 e 11 para os resultados intradia e nas Tabelas 12, 13, 14 e 15 para interdia, divididas em dois dias de estudo.

Tabela 8: Dados de precisão e exatidão intracorridas na concentração do limite de quantificação, para um valor teórico de 1500 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para NCT e CLZ, respectivamente.

Composto	Nº Replicatas	Média ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	DP	Precisão (%)	Recuperação (%)
NCT	4	1590,7	198,0	12,4	106,0
NCT/BRZ	3	1576,0	183,1	11,6	105,1
CLZ	4	84,1	3,2	3,9	1
CLZ/BRZ	4	103,8	12,1	3,9	103,8

A tabela acima apresenta precisão de 12,4% para a NCT sem PI e 11,6% com PI, já para CLZ os valores são de 3,9% com e sem PI. No limite de quantificação os parâmetros ficaram dentro do valor estipulado pela resolução da ANVISA de 20%.

Tabela 9: Dados de precisão e exatidão intracorridas em concentração baixa (CQB), para um valor teórico de 3000 e 300 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para NCT e CLZ, respectivamente.

Composto	Nº Replicatas	Média ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	DP	Precisão (%)	Recuperação (%)
NCT	5	3964,7	442,1	11,2	132,2
NCT/BRZ	5	3170,5	392,8	12,4	105,7
CLZ	3	411,5	29,2	8,9	137,2
CLZ/BRZ	5	376,6	41,0	10,9	125,5

A tabela acima apresenta precisão de 11,2% para a NCT sem PI e 12,4% com PI, já para CLZ os valores são de 8,9% sem PI e 10,9% com PI. O parâmetro precisão para o CQB permaceu dentro do valor estipulado pela resolução da ANVISA de 15%. A recuperação ou exatidão apresentou apenas a NCT/BRZ dentro do limite estabelecido.

Tabela 10: Dados de precisão e exatidão intracorridas em concentração média (CQM), para um valor teórico de 3750 e 650 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para NCT e CLZ, respectivamente.

Composto	Nº Replicatas	Média ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	DP	Precisão (%)	Recuperação (%)
NCT	3	4479,4	250,1	5,6	119,5
NCT/BRZ	2	3724,3	101,4	2,7	99,3
CLZ	4	746,8	82,8	11,1	114,9
CLZ/BRZ	3	628,9	129,8	20,6	96,7

Na tabela acima, apenas a precisão da CLZ/BRZ (20,6%) ultrapassou o limite de 15%, ficando a CLZ com 11,1% e NCT, NCT/BRZ com 5,6 e 2,7%, respectivamente. Apenas a recuperação da NCT ficou acima do limite com um erro relativo de 19,5%. Para as demais, a CQM ficou com erro relativo de 0,7% para NCT/BRZ, 14,9% para CLZ e 3,3% para CLZ/BRZ.

Tabela 11: Dados de precisão e exatidão intracorridas em concentração alta (CQA), para um valor teórico de 4200 e 8000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para NCT e CLZ, respectivamente.

Composto	Nº Replicatas	Média ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	DP	Precisão (%)	Recuperação (%)
NCT	5	4539,6	536,6	12,4	108,1
NCT/BRZ	3	4218,3	240,6	5,7	100,4
CLZ	5	923,0	87,4	9,5	115,4
CLZ/BRZ	3	977,3	103,5	10,6	122,2

A precisão dos compostos com e sem PI ficaram abaixo dos 15% estipulados pela ANVISA, com 12,4% e 5,7% para NCT com e sem PI, respectivamente. Para CLZ, a precisão ficou entre 10%. Na recuperação, a CLZ com e sem PI ultrapassou o limite, apresentando erro relativo de 15,4% e 22,2%, respectivamente. NCT ficou com 8,1% sem PI e 0,4% com PI para a CQA.

Tabela 12: Dados de precisão e exatidão intercorridas no limite de quantificação (LIQ), para um valor teórico de 1500 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para NCT e CLZ, respectivamente.

	NCT	NCT/BRZ	CLZ	CLZ/BRZ
1º dia ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	1590,7	1576,0	84,1	103,8
2º dia ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	1788,2	2201,8	158,2	51
Média	1689,5	1888,9	121,2	77,4
DP	139,7	442,5	52,4	37,3
Precisão (%)	8,3	23,4	43,2	48,2
Recuperação (%)	111,2	120,6	117,5	70,8

A tabela acima apresenta valores de precisão e exatidão intercorrida. Este ensaio foi realizado um dia depois ao ensaio intracorrida. Ambos os parâmetros precisão e recuperação, no limite de quantificação, apenas a NCT sem PI apresentou valor abaixo de 20% (8,3% para precisão e 11,2% para recuperação). O composto CLZ apresentou precisão maior que 40% tanto com PI como sem PI. Estes valores podem ser explicados devido a extração não ter sido eficiente em todas as replicatas. A recuperação para a NCT/BRZ ficou próxima dos 20%, ultrapassando apenas 0,6% do estipulado, enquanto a CLZ apresentou erro relativo de 17,5% sem PI e 29,2% com PI. Neste último caso, a integração do PI pode ser a justificativa para os valores distintos da CLZ.

Tabela 13: Dados de precisão e exatidão intercorridas na concentração baixa (CQB), para um valor teórico de 3000 e 300 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para NCT e CLZ, respectivamente.

	NCT	NCT/BRZ	CLZ	CLZ/BRZ
1º dia ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	3964,7	3170,5	411,5	376,6
2º dia ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	2747,1	2988,3	327,5	244,1
Média	3355,9	3079,4	369,5	310,4
DP	861,0	128,8	59,4	93,7
Precisão(%)	25,7	4,2	16,1	30,2
Recuperação (%)	110,6	102,6	118,8	103,3

Os valores para precisão, apresentadas acima, demonstram variação tanto para NCT quanto para CLZ com e sem PI. Para a NCT ocorreu variação de 21,5% entre os CQBs com e sem PI e para a CLZ a variação ficou 14,1%. Esses resultados podem ser explicados pela flutuação nas áreas da NCT e CLZ sem PI. Apenas a NCT com PI ficou abaixo dos 15% estipulados. Na recuperação, a CLZ sem PI ultrapassou o limite em 3,8%, as demais apresentaram erro relativo abaixo de 10,6%.

Tabela 14: Dados de precisão e exatidão intercorridas na concentração média (CQM), para um valor teórico de 3750 e 650 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para NCT e CLZ, respectivamente.

	NCT	NCT/BRZ	CLZ	CLZ/BRZ
1º dia ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	4479,4	3724,3	746,8	628,9
2º dia ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	2670,6	2068,8	317,4	233,9
Média	3575,0	2896,6	532,1	431,4
DP	1279,0	1170,6	303,6	279,3
Precisão(%)	35,8	40,4	57,1	64,7
Recuperação (%)	95,1	70,5		50,7

Na CQM, tanto a precisão quanto a recuperação ficaram fora dos 15% estipulados pela ANVISA. A precisão para NCT com e sem PI apresentou em média 38,1%, enquanto a CLZ com e sem PI apresentou em média 60,9%. Valores muito acima do esperado, que podem ser justificados pela grande flutuação na concentração e baixa extração dos analitos. Na recuperação, apenas a NCT apresentou erro relativo de 4,9%, as demais foram de 29,5% para NCT/BRZ, 22,2% para CLZ e 50,7% para CLZ/BRZ.

Tabela 15: Dados de precisão e exatidão intercorridas na concentração alta (CQA), para um valor teórico de 4200 e 800 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para NCT e CLZ, respectivamente.

	NCT	NCT/BRZ	CLZ	CLZ/BRZ
1º dia ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	4539,6	4218,3	923	977,3
2º dia ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	4252,1	4013,9	770,3	824,6
Média	4395,9	4116,1	846,7	901,0
DP	203,3	144,5	108,0	108,0
Precisão(%)	4,6	3,5	12,8	12,0
Recuperação (%)	104,5	98,0	105,5	111,2

Os valores de precisão e recuperação para a CQA ficaram abaixo de 15%. Para a NCT com e sem PI a precisão apresentou 4,6 e 3,5%, respectivamente. Para a CLZ com e sem PI a precisão ficou em 12%. Recuperação para NCT apresentou em média erro relativo de 3,3% e a CLZ com 8,4%.

O presente trabalho procurou demonstrar os parâmetros com e sem a utilização do PI, para verificar se a sua ausência provocaria alteração significativa na validação. Contudo, a validação de replicatas nos pontos de concentração interferiu substancialmente nos valores de precisão e exatidão, inviabilizando uma comparação estatística entre valores analisados apenas com o analito de interesse e valores analisados com a relação analito/PI.

Também houve dificuldade durante a integralização de muitos picos dos analitos nos cromatogramas, o que pode representar uma segunda possível justificativa para a extrapolação dos valores nos parâmetros de precisão e exatidão. Essa dificuldade pode ser atribuída, em parte, à coluna monolítica que oferece menor área superficial se comparada às colunas convencionais. Com isso, o tempo de contato entre substâncias e monólito é desfavorecida,

acarretando alargamento nos picos. A falta de simetria nos picos provoca variação da área durante o processo de integralização que afetará de forma significativa a concentração e, por conseguinte, a validação.

4.4.5 Estabilidade

Os resultados para o ensaio da estabilidade estão mostrados na Tabela 16.

Tabela 16: Dados de estabilidade de curta duração na concentração baixa (CQB) e alta (CQA), para um valor teórico de 3000 e 4200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para NCT e 100 e 800 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para CLZ.

	NCT	NCT/BRZ	CLZ	CLZ/BRZ
CQB				
Média ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	3740,5	2884,6	411,5	287,2
DP	431,5	13,5	29,2	29,2
Estabilidade %	19,8	4,0	27,1	4,5
CQA				
Média ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	4256,5	4218,3	808,7	737,3
DP	492,6	240,6	53,7	150,3
Estabilidade %	1,3	0,4	1,1	8,5

Quanto à estabilidade, a ANVISA (BRASIL, 2012) estabelece o limite de desvio de até $\pm 15\%$ da média das concentrações obtidas com relação ao valor teórico. Os resultados obtidos, apresentados na Tabela 16, mostram que a estabilidade para NCT e CLZ sem a utilização de PI ficou acima do limite estabelecido.

4.4.6 Efeito de Matriz

Os resultados do ensaio de efeito de matriz são apresentados na Tabela 17:

Tabela 17: Dados para análise do efeito de matriz na concentração baixa e alta (CQB e CQA), para um valor teórico de 3000 e 4200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para NCT e 100 e 800 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para CLZ.

FMN	NCT/BRZ	CLZ/BRZ	NCT	CLZ
CQB	1,4	1,3	0,9	0,8
	1,5	1,3	0,9	0,7
	1,3	1,2	0,8	0,8
CQA	0,9	1,1	0,8	1,0
	1,1	1,1	0,9	0,9
	1,0	1,0	0,8	0,8
Médias				
CQB	1,4	1,3	0,9	0,8
CQA	1,0	1,1	0,9	0,9
DP				
CQB	0,11	0,04	0,02	0,06
CQA	0,13	0,16	0,05	0,10
CV%				
CQB	7,9	3,3	2,9	7,8
CQA	12,5	5,4	5,8	10,5

É possível observar que os CV dos FMNs das amostras de plasma foi inferior a 15%, conforme preconizado pela ANVISA (BRASIL, 2012). O parâmetro efeito residual não mostrou picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos.

Um dos pontos de dificuldade do estudo foi a quantidade restrita de material biológico, tendo em vista a seleção de uma só bolsa de plasma. Esse componente fez com que mais testes não pudessem ser realizados para completar a validação.

5 CONCLUSÕES

No presente trabalho foi desenvolvida a metodologia para a quantificação de NCT, CLZ em cromatografia líquida de fase reversa com detecção UV empregando coluna monolítica.

Comparado aos métodos descritos na literatura, o método desenvolvido apresentou-se como simples e rápido (fase móvel acetonitrila:metanol:solução tampão acetato de sódio com 6 minutos de corrida) e também inovador por inserir coluna monolítica a metodologia. A extração apresentou vantagens quanto à utilização de reagentes e materiais de baixo custo (sulfato de zinco, hidróxido de cálcio e unicamente 2 mL de clorofórmio).

O padrão interno foi avaliado como dispensável por não apresentar significativa alteração positiva nos resultados obtidos durante a validação. Devido a picos desconhecidos no mesmo tempo de retenção do metabólito N-desmetilclozapina, este não pôde ser quantificado nos ensaios de validação.

Os resultados dos parâmetros avaliados na validação (Seletividade, Linearidade, LD, LIQ, precisão e exatidão, estabilidade e efeito de matriz) mostram que a metodologia pode ser aplicada em amostras reais.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVIR, J.M. et al. Clozapine-induced agranulocytosis. Incidence and risk factors in the United States. **N Engl J Med**, v.329 n°3, p.162-167, 1993.

ANANDATHEERTHAVARADA, H. K.; WILLIAMS, J. F.; WECKER, L.. Differential effect of chronic nicotine administration on brain cytochrome P4501A1/2 and P4502E1. **Biochemistry Biophysical Res Commun**, v.194, p.312–318, 1993.

ARAVAGIRI, M.; MARDER, S.R. Simultaneous determination of clozapine and its N-desmethyl and N-oxide metabolites in plasma by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry and its application to plasma level monitoring in schizophrenic patients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, p. 301-311, 2001.

AUDI, E. A. Isoenzimas do CYP450 e biotransformação de drogas. **Acta Scientiarum**, 599–604, 2000.

BAUMANN, F. et al. Determination of nicotine and cotinine in human serum by means of LC/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 107-111, 2010.

BENOWITZ, N. Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. **Annu. Rev. Pharmacological Toxicology**, v 36, p 596–613, 1996.

BORDIN, M. C. et al. A Rapid Assay for the Simultaneous Determination of Nicotine, Cocaine and Metabolites in Meconium Using Disposable Pipette Extraction and Gas ChromatographyMass Spectrometry (GCMS). **Journal of Analytical Toxicology**, v 38, Ed 1, p 31-38, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da ANVISA. Disponível em www.anvisa.gov.br. Acesso em 17 jul. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registros e pós-registro de medicamentos. Disponível em www.anvisa.gov.br. Acesso em 19 jul. 2013.

CHANG, Y. Simultaneous determination of nicotine and its metabolite, cotinine, in rat blood and brain tissue using microdialysis coupled with liquid chromatography: Pharmacokinetic application. **Journal of Chromatography A**, v. 1088, p. 152-157, 2005.

CHUNG, M. et al. Determination of clozapine and desmethylclozapine in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography**, v. 613, p. 168-173, 1993.

COLLINS, C. B.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S.. **Fundamentos de cromatografia**. São Paulo. Ed Unicamp, 2006.

DEVINSKY, O.; PACIA, S. V.. Seizures during clozapine therapy. **Journal Clinical Psychiatry**, v.55 Suppl B. p.153-156, 1994.

DOBRINAS M. et al. Quantification of nicotine, cotinine, trans-3-hidroxicotinine and varenicline in human plasma by a sensitive and specific UPLC-tandem mass-spectrometry procedure for a clinical study an smoking cessation. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 3574 – 3582, 2011.

EDNO, L. et al. Assay for quantitation of clozapine and its metabolite N-desmethylclozapine in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 16, p. 311-318, 1997.

EL DEEB, S. Monolithic Silica For Fast HPLC: Current Success and Promising Future. **Chromatographia**, v. 74, p. 681-691, 2011.

FARIA, A. M. et al. Fases Estacionárias Monolíticas para separações cromatográficas. **Química Nova**, v. 29, n 2, p. 300–309, 2006.

FERGUSON, C. S.; TYNDALE, R. F. Cytochrome P450 enzymes in the brain: emerging evidence of biological significance. **Trends in Pharmacological Science**, v 32, n 12, p. 708-714, 2011.

FEKETE, S. et al. Importance of instrumentation for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2013.

FONSECA, B. M. et al. Determination of seven selected antipsychotic drugs in human plasma using microextraction in packed sorbent and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical e Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 3953-3963, 2013.

FRANÇA, J.A. Desenvolvimento de método para determinação de xenobióticos em imaturos de insetos necrófagos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (lc-ms/ms). Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2013, 100f.

GHOSHEH, O.A. et al. A simple high performance liquid chromatographic method for the quantification of total cotinine, total 3-hidroxicotinine and caffeine in the plasma of smokers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, p. 543-549, 2000.

HAKAN, K. G. et al. Clozapine Inhibits Development and Expression of Nicotine Induced Locomotor Sensitization in Rats. **Synapse**, v. 63, p. 15-21, 2009.

HARTMANN, C. et al. Validation of bioanalytical chromatographic methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, p. 193–218, 1998.

HEFNAWY, S.; AL-OMAR, M.; JULKHUF, S. Rapid and sensitive simultaneous determination of ezetimibe and simvastatin from their combination drug products by monolithic silica high-performance liquid chromatographic column. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, pg 527-534, 2009.

HUKKANEN, J. et al. Effect of nicotine on cytochrome P450 1A2 activity. **British Journal Clinical Pharmacology**, v.72, n°5, p.836-838, 2011.

IBA, M.M.; FUNG, J.. Induction of pulmonary cytochrome P4501A1: interactive effects of nicotine and mecamylamine. **Europe Journal Pharmacology**, v.383, p.399–403, 1999.

IBA, M.M. et al.. Dose-dependent up-regulation of rat pulmonary, renal, and hepatic cytochrome P-450 (CYP)1A expression by nicotine feeding. **Drug Metabolite Disposition**, v.27, p.977–982, 1999.

IBA, M.M. et al.. Induction of pulmonary CYP1A1 by nicotine. **Xenobiotica**, v.28, p.827–843, 1998.

JANN, M. W. et al. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of clozapine. **Clinical Pharmacokinet**, v. 24, p 161–76, 1993.

JABLONSKI, J.E.; SCHLESSER, J.E; MARIAPPAGAUDAR, P. HPLC-UV Method for nicotine, strychnine, and aconitine in dairy products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7460-7465, 2006.

KAUR, H. et al. Development and Validation of High performance liquid chromatographic method for analysis of clozapine. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science**, v. 26, p. 465-472, 2013.

LANÇAS, F. M. Cromatografia Líquida moderna: HPLC/CLAE. São Paulo, Ed. Átomo, 2009.

LEON J. et al. Does Clozapine decrease smoking? **Neuro-Psychopharmacology e Biological Psychiatry**, v. 29, p. 757-762, 2005.

LEVIN, E. R.; REZVANI, A. H. Nicotinic interactions with antipsychotic drugs, models of schizophrenia and impacts on Cognitive function. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, p. 1182-1191, 2007.

LINDA, L.N.G. Sample Preparation by Salts Precipitation and Quantitation by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection of Selected Drugs in Biological Fluids. **Journal of Chromatography**, v. 257, p. 354–353, 1983.

LIU, Y.Y.; DOUDE VAN TROOSTWIJK, L.J.A.E.; GUCHELAAR, H.J. Simultaneous determination of clozapine, norclozapine and clozapine-N-oxide in human plasma by high-performance chromatography with ultraviolet detection. **Biomedical Chromatography**, v. 15, p. 280-286, 2001.

LUNELL, E. M. t al. Site of nicotine absorption from a vapour inhaler - comparison with cigarette smoking. **Europe Journal Clininal Pharmacology**, v.55, p. 737–41, 2000.

MADEJ, K.; BIEDRON, A.; GARBACIK, A. Study of Separation and Extraction Conditions for five neuroleptic drugs by an LLE- HPLC- DAD Method in Human Plasma. **Journal of Liquid Chromatography e Related Technologies**, v. 32, p. 3025-3037, 2009.

MALDANER, L.; COLLINS C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Fases Estacionárias Modernas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fases reversas. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1559–1568, 2010.

MATUSZEWSKY, B.K; CONSTANZER, M.L.; CHAVEZ-ENG, C.M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bionalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 3019-3030, 2003.

MERCOLINI, L. et al. Simultaneous determination of the antipsychotic drugs levomepromazine and clozapine and their main metabolites in human plasma by a HPLC-UV method with solid-phase extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 846, p. 273-280, 2007.

MCEVOY J.P.; FREUDENREICH, O.; WILSON, W.H. Smoking and Therapeutic Response to Clozapine in Patients with Schizophrenia. **Society of Biological Psychiatry**, v. 46, p. 125-129, 1999.

MING, D.S.; HEATHCOTE, J. Therapeutic Drug Monitoring of clozapine and Norclozapine in Human Serum using Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 33, 2009.

MOFFAT, A. C. (2005). Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. London: Pharmaceutical Press. Eletronic version. Disponível em: www.pharmpress.com. Acesso em 25 de jul de 2012.

MOSIER, K.E. et al. Determination of clozapine, and its metabolites, N-desmethylclozapine and clozapine N-oxide in dog plasma using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 783, p. 377-382, 2003.

MUELLER, C. et al. Determination of Caffeine, Myosmine, and Nicotine in Chocolate by Headspace Solid-Phase Microextraction Coupled with Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Food Science**, v. 79 Ed.2, p. T251-T255, 2014.

NATISHAN, T.K. **Journal of liquid chromatography and related tecnologies**, v. 34, p. 1133-1156, 2011.

NAKAJIMA M. et al. Improved highly sensitive method for determination of nicotine and cotinine in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 742, p. 211–215, 2000.

PETERS, F.T.; DRUMMER, O.H.; MUSSHOFF, F. Validation of new methods. **Forensic Science International**, v.165, p.216–224, 2007.

PRICE, R.J. et al.. Metabolism of nicotine and induction of CYP1A forms in precision-cut rat liver and lung slices. **Toxicology In Vitro**, v.18, p.179–185, 2004.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

REZVANI A.H. et al. Nicotine and clozapine effects on attentional performance impaired by the NMDA antagonist dizocilpine in female rats. **International Journal of neuropsychopharmacology**, v. 11, p. 63-70, 2008.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n.5, p. 771-780, 2004.

ROSE, J. E. et al. Arterial nicotine Kinetics during cigarette smoking and intravenous nicotine administration: implications for addiction. **Drug Alcohol Depend**, v.56, p. 99–107, 1999.

ROSEMBERG, J. Nicotina Droga Universal. 2004. Acesso em 25 mai de 2012, disponível em www.inca.gov.br.

RUELA, A.L.M.; ARAÚJO, M.B.; PEREIRA, G.R. Desenvolvimento e validação de um método analítico rápido por cromatografia líquida de alta eficiência de nimesulida em estudos de liberação in vitro. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 165-168, 2009.

SANDSON, N. B. et al. Clozapine case series. **Psychosomatics**, v.48, p. 170–5, 2007.

SAUNDERS, K. et al. Separation and sample pre-treatment in bioanalysis using monolithic phases:. **Analytica Chimica Acta**, v. 652, p. 22–31, 2009.

SHAHROKHIAN, S.; KAMALZADEH, Z.; HAMZEHLLOEI, A. Electrochemical determination of clozapine on MWCNTs/New Coccine doped PPY modified GCE: An experimental design approach. **Bioelectrochemistry**, v. 90, p. 36-43, 2013.

SHAKLEYA, D.M.; HUESTIS, M.A. Simultaneous and sensitive measurement of nicotine, cotinine, trans-3-hydroxycotinine and norcotinine in human plasma by liquid

chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 3537-3542, 2009.

SHARIF, Z.A.. Pharmacokinetics, metabolism, and drug-drug interactions of atypical antipsychotics in special populations. **Journal Clinical Psychiatry**, v. 5, n. Suppl. 6, p. 22-25, 2003.

SHEN, Y.L. et al. Simultaneous determination of clozapine, clozapine N-oxide, N-desmethylclozapine, risperidone, and 9-hydroxyrisperidone in plasma by high performance liquid chromatography with ultravioleta detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 460, p. 201-208, 2002.

SINGH, S. et al.. Nicotine and caffeine-mediated modulation in the expression of toxicant responsive genes and vesicular monoamine transporter-2 in 1-methyl 4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease phenotype in mouse. **Brain Res** v.1207, p.193–206, 2008.

SILVA, R.; COLLINS, C.; BOTTOLI, C. Cromatografia líquida capilar: estado da arte e aplicações. **Química Nova**, v.34, p. 841–849, 2011. SONG, M. et al. LC-MS-MS determination and pharmacokinetic study of clozapine in human plasma. **Chromatographia**, v. 69, p. 1049-1054, 2009.

STOLKER, A.A.M. et al. Determination of nicotine and cotinine in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1020, p. 35-43, 2003.

TANDON, R. G. Definition and description of schizophrenia in the DSM - 5. **Schizophrenia Research**, v. 150, p. 3-10, 2013.

TANG, Y. G. et al. Cigarette smoking in Chinese mole inpatientes with schizophrenia: A cross-sectional analysis. **Journal of Psychiatric Research**, v. 41, p. 43-48, 2007.

TIMOTEO, M.O. Estudo de Bioequivalência da Clozapina em Pacientes Psicóticos no Estado de Equilíbrio. Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2008, 114 f.

URINOVSKA, R. et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum. **Journal of Chromatography B**, v. 907, p. 101-107, 2012.

VARDAKOU, I. et al. Validated CG/MS method for the simultaneous determination of clozapine and norclozapine in human plasma. Application in psychiatric patients under clozapine treatment. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 2327-2332, 2010.

WALDSCHMITT C.; PFUHLMANN, B.; HIEMKE, C. Analysis of Multiple Antidepressant and Antipsychotic Drugs Including Active Metabolites in Serum of Psychiatric Patients by LC with Column Switching and Spectrophotometric Detection. **Chromatographia**, v. 69, n. 9/10, p. 821-827, 2009.

WEIGMANN, H.; HIEMKE, C. Determination of clozapine and its major metabolites human serum using automated solid phase extraction subsequent isocratic high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography**, v. 583, p. 209-216, 1992.

WOHLFARTH A. et al. Sensitive quantification of clozapine and its main metabolites norclozapine and clozapine-N-oxide in serum and urine using LC-MS/MS after simple liquid-liquid extraction work-up. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 400, p. 737-46, 2011.

XU Y. et al. Fast and selective extraction of nicotine from human plasma based on magnetic strong cation exchange resin followed by liquid chromatography - tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, p. 517-526, 2011.

ZHOU, Z. et al. Simultaneous determination of clozapine, olanzapine, risperidone and quetiapine in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 802, p. 257-262, 2004.

YASUDA M. et al. Simultaneous determination of nicotine and cotinine in serum using high-performance liquid chromatography with fluorometric detection and postcolumn UV-photoirradiation system. **Journal of Chromatography B**, v. 934, p. 41-45, 2013.