



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica

FERNANDO HEBLING ARRIVABENE MORENO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO BIOANALÍTICO “VERDE” EM
HPLC PARA MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DE CLOZAPINA E *N*-
DESMETILCLOZAPINA (METABÓLITO ATIVO) EM PLASMA DE
PACIENTES PSIQUIÁTRICOS**

Araraquara, SP

2023

FERNANDO HEBLING ARRIVABENE MORENO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO BIOANALÍTICO “VERDE” EM
HPLC PARA MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DE CLOZAPINA E N-
DESMETILCLOZAPINA (METABÓLITO ATIVO) EM PLASMA DE
PACIENTES PSIQUIÁTRICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutico Bioquímico.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cleopatra da Silva Planeta

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Helen Mariana Baldan Cimatti

Araraquara, SP

2023

M843d Moreno, Fernando Hebling Arrivabene.
Desenvolvimento de método bioanalítico "VERDE" em *HPLC* para monitorização terapêutica de clozapina e *N*-Desmetilclozapina (metabólito ativo) em plasma de pacientes psiquiátricos / Fernando Hebling Arrivabene Moreno. – Araraquara, 2022.
31 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação: Farmácia Bioquímica).
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Cleopatra da Silva Planeta.
Coorientadora: Helen Mariana Baldan Cimatti.

1. Clozapina. 2. *N*-Desmetilclozapina. 3. Monitorização Terapêutica.
4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. I. Planeta, Cleopatra da Silva, orient. II. Cimatti, Helen Mariana Baldan, coorient. III. Título.

Agradecimentos

Aos meus familiares, por me proporcionarem condições e total apoio para que eu pudesse concluir a graduação em uma faculdade que foi tão, por mim, sonhada. Que me acompanharam durante toda essa trajetória e sempre fizeram o impossível para me manter motivado.

Aos meus amigos, que fizeram parte de cada momento dessa jornada e fizeram com que essa fosse inesquecível. Colegas estes que me garantiram a força e a motivação para enfrentar os diversos desafios encontrados neste caminho.

Aos meus colegas professores, em especial minhas orientadoras Cleópatra da Silva Planeta e Helen Mariana Baldan Cimatti, que sempre abraçaram minhas ideias e ajudaram a tornar possível meus planos, que tanto me ensinaram e me deram condições para atingir meus objetivos.

Aos Laboratórios de Farmacognosia e Neuropsicofarmacologia, que abriram suas portas e seus braços para que eu pudesse realizar minhas iniciações científicas e me deram total suporte durante minhas pesquisas. Em especial ao professor André Gonzaga e o mestrando André Faibicher, que acompanharam diariamente os desafios deste projeto e me ajudaram a superar os obstáculos nele encontrados.

À Professora Patrícia Moriel e seu doutorando João Kleber, do laboratório de Farmácia Clínica da UNICAMP, pela colaboração neste projeto, garantindo que o mesmo pudesse ser realizado tanto com a disponibilização de amostras e padrões, como também oferecendo todo o auxílio e disponibilidade para discussões da pesquisa. À professora Maria Eugênia, da USP campus Ribeirão Preto, pela gentil doação do padrão *N*-Desmetilclozapina fundamental para a realização deste trabalho.

À Ciência e à Universidade Pública, em destaque à Universidade Estadual Paulista, que garantiu a construção de um sonho e a formação deste aluno que deve tudo à esta instituição. Nesta, vivi meus melhores momentos, conheci as melhores pessoas e aproveitei verdadeiramente cada dia e cada oportunidade.

Por fim, à minha avó Adelaide, que por pouco não conseguiu me ver formar, mas que sempre foi uma imensa fonte de amor e cuidado. Eu te amo para sempre!

Resumo

A esquizofrenia é uma doença que atinge o sistema nervoso central (SNC) e é definida como um transtorno psicótico maior, caracterizado por sintomas psicóticos positivos e negativos. O tratamento farmacológico é realizado com a administração de antipsicóticos, dentre eles a clozapina (CLZ), um antipsicótico atípico que não causa efeitos adversos extrapiramidais. Porém, o seu uso tem sido relacionado com casos de agranulocitose e, por isso, passou a ter um olhar mais rigoroso, tanto na prescrição quanto no acompanhamento de pacientes. A clozapina é um fármaco absorvido no trato gastrointestinal e majoritariamente metabolizado pelo fígado, pelas isoenzimas do citocromo P450 (CYP). Destas, a CYP1A2 é a principal enzima no metabolismo da clozapina, levando, juntamente a outras enzimas, à formação do metabólito *N*-desmetilclozapina, sendo este farmacologicamente ativo. O uso de antipsicóticos requer muitas vezes a Monitorização Terapêutica de Fármacos (TDM) para controle e determinação dos fármacos e metabólitos ativos em amostras biológicas, como plasma, soro ou urina. A TDM objetiva a manutenção das concentrações plasmáticas do fármaco em faixas terapêuticas, auxiliando na eficácia do tratamento e no manejo de reações adversas a medicamentos (RAMs). O objetivo do presente projeto é realizar a adequação e padronização de metodologias já descritas para monitorização terapêutica da clozapina e *N*-desmetilclozapina (metabólito ativo) em plasma de pacientes, de modo a eliminar solventes prejudiciais ao meio ambiente do método bioanalítico. Foram utilizados cromatógrafos Shimadzu® HPLC-UV-VIS e Waters® HPLC ACQUITY QDa, equipados com coluna C18 (5 µm, 4,6 mm x 250 mm) e injetor automático. O comprimento de onda analisado foi de 254 nm (HPLC UV-VIS), e foi busca pelas *m/z* 313 (*N*-Desmetilclozapina), 321 (*N*-Desmetilclozapina D8) e 327 (clozapina) no HPLC-MS. A fase móvel foi avaliada com diferentes proporções e combinações dos solventes acetato de amônio 10 mM (ajustado para diferentes pH com ácido acético glacial), acetonitrila (ACN), metanol e etanol, em método isocrático, com vazão de 1000 µL/min, e volume de injeção de 20 ou 50 µL. A extração das amostras foi realizada por desproteínização por adição de acetonitrila e metanol gelados, e a concentração das amostras por evaporação dos solventes e ressuspensão em menor volume. O método cromatográfico que apresentou, numa perspectiva geral, melhor resultado foi o modo isocrático, em HPLC-MS, com fase móvel 73:27 de tampão acetato (acetato de amônio 10 mM, pH 2,8) e etanol, respectivamente, com volume de injeção de 50 µL, tempo de análise de 20 minutos.

Palavras-chave: Clozapina. *N*-Desmetilclozapina. Monitorização Terapêutica. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Abstract

Schizophrenia is a disease that affects the central nervous system (CNS) and is defined as a major psychotic disorder, characterized by positive and negative psychotic symptoms. Pharmacological treatment is performed with the administration of antipsychotics, including clozapine (CLZ), an atypical antipsychotic that does not cause extrapyramidal adverse effects. However, the use of clozapine has been associated with cases of agranulocytosis and, therefore, its use has become more rigorous in the prescription and in the follow-up of these patients. Clozapine is a drug absorbed from the gastrointestinal tract and mostly metabolized by the liver, by cytochrome P450 (CYP) isoenzymes. Of these, CYP1A2 is the main enzyme in the metabolism of clozapine, leading, together with other enzymes, to the formation of the metabolite *N*-desmethylclozapine, which is pharmacologically active. The use of antipsychotics often requires Therapeutic Drug Monitoring (TDM) to control and determine active drugs and metabolites in biological samples, such as plasma, serum or urine. TDM aims to maintain drug plasma concentrations within therapeutic ranges, helping to effectively treat the disorder and manage adverse drug reactions (ADRs). The objective of this study is to adapt and standardize methodologies already described for therapeutic monitoring of clozapine and *N*-desmethylclozapine (active metabolite) in patient plasma, in order to eliminate solvents harmful to the environment from the bioanalytical method. In this work, were used: Shimadzu® HPLC-UV-VIS and Waters® HPLC ACQUITY QDa chromatographs, equipped with a C18 column (5 µm, 4.6 mm x 250 mm) and an automatic injector. The analyzed wavelength was 254 nm (HPLC UV-VIS), and *m/z* 313 (*N*-Desmethylclozapine), 321 (*N*-Desmethylclozapine D8) and 327 (clozapine) were searched on the HPLC-MS. The mobile phase was evaluated with different proportions and combinations of 10 mM ammonium acetate solvents (adjusted to different pH with glacial acetic acid), acetonitrile (ACN), methanol and ethanol, in an isocratic method, with a flow coefficient of 1000 µL/min, and injection volume of 20 or 50 µL. Samples were extracted by deproteinization by adding cold acetonitrile and methanol, and samples were concentrated by solvent evaporation and resuspension in a smaller volume. The chromatographic method that presented, in a general perspective, the best result was the isocratic mode, in HPLC-MS, with mobile phase 73:27 of acetate buffer (10 mM ammonium acetate, pH 2.8) and ethanol, respectively, with volume of 50 µL injection, analysis time of 20 minutes.

Keywords: Clozapine. *N*-Desmetilclozapine. Therapeutic Monitoring. High Performance Liquid Chromatography

Lista de Ilustrações

Figura 1. Metabolização da clozapina pelas enzimas do Citocromo P450 com consequente formação do metabólito ativo *N*-desmetilclozapina.

Figura 2. Cromatogramas obtidos em HPLC UV-VS (Shimadzu), em métodos isocráticos. FM em (A) sistema triplo de tampão acetato, metanol e ACN, nas proporções 5:2:3 em pH 5,0, onde o maior pico representa a CLZ (100 µg/mL) e o menor D-CLZ D8 (50 µg/mL), e em (B) cromatogramas sobrepostos para comparação em pH 3,5 nas proporções 53:18:29 (pico 1 e 2), 58:16:26 (picos 3 e 4) e 63:14:23 (picos 5 e 6). *N*-Desmetilclozapina D8 (50 µg/mL) representada nos picos 1, 3 e 5, e a clozapina (50 µg/mL) em 2, 4 e 6.

Figura 3. Cromatogramas obtidos em HPLC UV-VS (Shimadzu) nas condições de FM em sistema duplo de ACN (A) ou etanol (B) em tampão acetato, nas proporções 31:69 em pH 3,0 (A), e em pH 2,8 (B) nas proporções 27:73, sendo em (A) ambos os padrões em concentração 16,7 µg/mL, e em (B) D-CLZ D8 em 16,7 µg/mL e CLZ em 8,3 µg/mL.

Figura 4. Cromatogramas obtidos em HPLC-MS (Waters alliance) nas condições de FM em sistema duplo de tampão acetato e etanol (73:27, pH 2,8), em concentração 10 µg/mL (A) e 50 ng/mL (B).

Figura 5. Cromatogramas obtidos em HPLC -MS (Waters alliance) na avaliação de eficiência de diferentes metodologias para extração do fármaco (clozapina) após o processo de concentração das amostras. O pico corresponde a 100 ng/mL.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Comparação de score de riscos de diferentes solventes utilizados em Cromatografia Líquida de alta Eficiência (PRAT et al., 2016 - adaptado).

Tabela 2. Condições cromatográficas utilizadas na padronização metodológica em HPLC UV-VIS.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACN: Acetonitrila

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLZ: clozapina (fármaco)

CQA: Controle de Qualidade Alto

CQB: Controle de Qualidade Baixo

CQM: Controle de qualidade Médio

CYP: Citocromo

D-CLZ: *N*-Desmetilclozapina (metabólito ativo)

D-CLZ D8: *N*-Desmetilclozapina D8 (padrão interno)

HPLC: *High Performace Liquid Cromatography*

m/z: Razão Massa/Carga

ODS: Objetivos de Desenvolvimento Sustentável

PI: Padrão Interno

RAM: Reações Adversas a Medicamentos

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

SNC: sistema nervoso central

TDM: Monitorização Terapêutica de Fármacos

UV/VIS: ultravioleta/visível

Sumário

Agradecimentos	4
Resumo	5
Lista de Ilustrações	7
Lista de Tabelas	8
Lista de Abreviaturas e Siglas	9
Sumário	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVO.....	16
2.1 Objetivos específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Aspectos Éticos.....	16
3.2 Materiais - Fármacos e Solventes.....	16
3.3. Método bioanalítico	17
3.4 Parte experimental	17
3.4.1 Processamento das amostras	17
3.4.2 Curva analítica	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5. CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS	25
ANEXOS	27
1 - ACN-MeOH.....	27
2 – 2X ACN 1:1	28
3 – ACN 2:1 – MeOH	29
4 – ACN 2:1	30
5 – ACN 3:1	31

1. INTRODUÇÃO

A esquizofrenia é uma doença que atinge o sistema nervoso central e é definida como um transtorno psicótico maior, caracterizado por sintomas psicóticos positivos e negativos. Os positivos caracterizam-se como delírios, alucinações e a própria psicose, que causam a desconexão do paciente com a realidade. Entre os negativos pode-se citar a desorganização de ideias e comportamentos, déficits cognitivos e motores e problemas interpessoais, o que levam ao isolamento social, tanto em aspectos emocionais quanto ocupacionais. (PANTELIS *et al.*, 2014).

Segundo a "Hipótese dopaminérgica", utilizada para explicar a manifestação dos sintomas nos pacientes, a produção ou sensibilidade aumentada para o neurotransmissor dopamina no sistema mesolímbico seria responsável pelos sintomas positivos da esquizofrenia. Enquanto a baixa concentração desta em regiões frontais do encéfalo explicaria os sintomas negativos. Essa hipótese foi sustentada pela eficácia do tratamento com antagonistas de receptores dopaminérgicos D2, mas hoje se sabe que outros neurotransmissores também estão envolvidos na fisiopatologia da esquizofrenia (SEDVALL e FARDE, 1995).

Transtornos psiquiátricos no geral são responsáveis por um grande impacto econômico, médico e social. O aparecimento dos sintomas costuma ter início na juventude, com causas não muito bem definidas, mas com grande influência genética e ambiental. A fisiopatologia destes transtornos são complexas e incluem características individualizadas, tanto em quesitos biológicos, genéticos e psicológicos, e envolve também fatores ambientais e psicossociais como: relacionamento interpessoal, exposição a eventos estressores, rede de apoio e nível socioeconômico (DICK *et al.*, 2015; UHER *et al.*, 2014; POLANCZYK *et al.*, 2009).

Para pacientes portadores de esquizofrenia a expectativa de vida é reduzida em aproximadamente 20 anos, quando comparados aos neurotípicos. O tratamento de pacientes com esquizofrenia é baseado na psicoterapia e reabilitação social, além do tratamento farmacológico com o uso de antipsicóticos, estes divididos em primeira (típicos) e segunda geração (atípicos). A clozapina (CLZ), um antipsicótico atípico, demonstrou grandes vantagens terapêuticas em pacientes refratários (que

não respondem a farmacoterapia padrão) e graves, com eficácia em sintomas positivos e negativos (LAURSEN *et al.*, 2014).

O antipsicótico atípico, clozapina, possui mecanismo de ação complexo e ainda hoje muito estudado. Foi observado alta afinidade por receptores serotoninérgicos 5-HT₆ e 5-HT₇, mas ainda não foi comprovado que esta propriedade seja responsável pela sua maior efetividade em pacientes refratários. Além disso, a clozapina apresenta menor afinidade para os receptores dopaminérgicos D₂, quando comparados aos antipsicóticos de primeira geração, e maior afinidade pelos receptores D₄ (localizados preferencialmente nas regiões cerebrais corticais e límbicas). A relação de afinidade deste fármaco com receptores 5-HT_{2A} e receptores D₂ tem sido uma forte hipótese de sua efetividade e da redução dos efeitos extrapiramidais, por isso, norteou o desenvolvimento dos demais fármacos desta classe (MEYER *et al.*, 2018).

O metabólito ativo da clozapina, possui um efeito sinérgico na terapia farmacológica, sendo um potente agonista muscarínico M₁. Embora a *N*-Desmetilclozapina não tenha apresentado bons resultados nos ensaios clínicos que propuseram seu uso como monoterapia para tratamento de pacientes portadores de esquizofrenia, ela orientou uma maior busca por agonistas colinérgicos no tratamento primário ou adjuvantes de melhora cognitiva para esses pacientes (MEYER *et al.*, 2018).

Porém, o uso da clozapina tem sido relacionado com casos de agranulocitose e, por isso, seu uso passou a ter um olhar mais rigoroso, tanto na prescrição quanto no acompanhamento hematológico destes pacientes. Além disso, este medicamento pode causar outros efeitos adversos, como: alto risco metabólico, redução do limiar convulsivo (dose dependente), hipotensão ortostática, sedação, ganho de peso, efeitos anticolinérgicos (especialmente constipação intestinal), hipersialose, entre outros. Portanto, o uso da clozapina foi limitado aos pacientes com esquizofrenia refratária e grave, e demanda acompanhamento constante da farmacoterapia (MEYER *et al.*, 2018).

A clozapina é um fármaco administrado pela via oral possuindo biodisponibilidade entre 27-50% após metabolismo de primeira passagem (BERSANI *et al.*, 2011). É também majoritariamente metabolizada pelo fígado, mais especificamente pelas isoenzimas do citocromo P450 (CYP). Destas, a CYP1A2 é a principal enzima responsável pelo metabolismo da clozapina. Outras enzimas que

atuam na biotransformação deste fármaco são as CYP2D6 e CYP3A4 que, juntamente com a CYP1A2, levam à formação do metabólito *N*-desmetilclozapina, sendo este farmacologicamente ativo (SIROT *et al.*, 2009; RAGGI *et al.*, 2004).

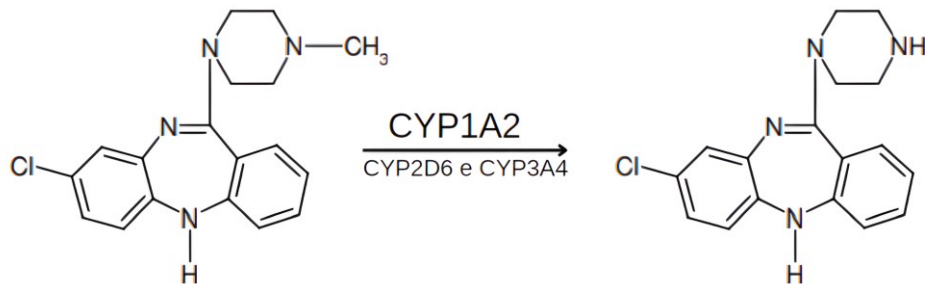


Figura 1. Metabolização da clozapina pelas enzimas do Citocromo P450 com consequente formação do metabólito ativo *N*-desmetilclozapina.

O uso de antipsicóticos requer muitas vezes a Monitorização Terapêutica de Fármacos (TDM) para controle e determinação dos fármacos e seus metabólitos ativos em amostras biológicas, como plasma, soro ou urina. A TDM objetiva a manutenção das concentrações plasmáticas do fármaco em faixas terapêuticas, auxiliando na eficácia do tratamento e no manejo de reações adversas a medicamentos (RAMs), que podem levar a hospitalização prolongada e até mesmo óbito de pacientes (LIMA *et al.*, 2019).

Em pacientes adultos, as concentrações plasmáticas de clozapina devem se encontrar em torno de 350 a 600 ng/mL. O metabólito ativo, *N*-desmetilclozapina, é monitorado juntamente ao fármaco já que suas concentrações plasmáticas são significativas, apresentando valores semelhantes aos de clozapina, mas podendo variar de acordo com a idade do paciente, uso de outros medicamentos ou até hábitos de vida, como o tabagismo. No público infantil, a monitorização ocorre de maneira diferente, uma vez que crianças são mais sensíveis a este fármaco (possivelmente por uma maior produção de seu metabólito ativo), devendo então possuir faixa de concentração plasmática terapêutica entre 200 a 400 ng/mL (WOHLFARTH *et al.*, 2011).

Para a realização da TDM utiliza-se, geralmente, sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que consiste num método físico-químico de separação pela interação diferencial entre os analitos da amostra e as fases móvel

(sistema solvente) e estacionária (fixa na coluna cromatográfica). O sistema é acoplado a algum tipo de detector, como UV/VIS ou espectrômetro de massas, o que permite, além da separação, a identificação e quantificação do analito. (MALDANER *et al.*, 2010).

Porém, as amostras biológicas apresentam diversas macromoléculas incompatíveis com o sistema de HPLC, sendo necessário um pré-tratamento da amostra para eliminação destes constituintes. O pré-tratamento pode ser realizado por diversas técnicas, entre elas a extração líquido-líquido, extração em fase sólida e a precipitação de proteínas. Esta última é embasada na susceptibilidade das proteínas à desnaturação, como por exemplo na exposição a solventes orgânicos, permitindo a liberação do fármaco e separação por técnicas simples de centrifugação e filtração. (QUEIROZ *et al.*, 2001).

A cromatografia líquida de alta eficiência enfrenta hoje o desafio de enquadrar-se na agenda de ações mundiais previstas e propostas pela Cúpula das Nações Unidas sobre os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), que preconizam o abandono do uso de solventes prejudiciais aos ecossistemas terrestres e marinhos, e a implementação de solventes mais aceitos pela "Química Verde", em consonância com as proposições dos ODS. Contudo, apesar deste grande movimento na ciência, ainda é escasso o número de métodos de quantificação de clozapina em plasma humano que cumpram com esses requisitos.

Os diferentes solventes, utilizados como fase móvel nas técnicas cromatográficas, podem oferecer diferentes riscos, como a segurança de trabalho, efeitos na saúde do operador e danos ao meio ambiente. O artigo publicado por Prat *et al.*, (2016) traz uma comparação de diversos solventes em diferentes aspectos. Dentre estes podemos destacar o uso da água, como comparativo de ausência de riscos, o etanol, metanol e acetonitrila, como vemos na tabela 1.

Tabela 1. Comparação de *score* de riscos de diferentes solventes utilizados em Cromatografia Líquida de alta Eficiência (PRAT *et al.*, 2016 - adaptado).

Solvente	Score		
	Segurança	Saúde	Meio Ambiente
Água	1	1	1
EtOH	4	3	3
MeOH	4	7	5
ACN	4	3	3

Recomendado
Problemático
Perigoso

Nesta avaliação, podemos observar um risco no ambiente de trabalho (segurança) categorizado como problemático para etanol, metanol e acetonitrila, o que se justifica pela inflamabilidade desses solventes. Nos parâmetros de saúde e meio ambiente, o etanol mostra-se recomendado, enquanto o metanol é classificado como sendo perigoso à saúde e problemático para o meio ambiente (PRAT *et al.*, 2016).

Quando avalia-se a acetonitrila o artigo trás uma problemática para seu método de classificação de *score*, uma vez que este subestimaria os riscos deste solvente. Ao observarmos a DL50 (em ratos), a acetonitrila apresenta valores de 200 mg/kg, enquanto o metanol possui valores de 5628 mg/kg, segundo a CETESB. Já os Valores Limite de Exposição Profissional (VLEP), em ppm, da acetonitrila é de 40 e metanol de 200. Unindo esses dados podemos perceber que os riscos inicialmente propostos na tabela 1 para a acetonitrila foram realmente subestimados, sendo este solvente nocivo à saúde e meio ambiente (PRAT *et al.*, 2016).

Para que seja proposto um novo método analítico faz-se necessária uma avaliação a fim de observar se este alcança resultados confiáveis e reprodutíveis, devendo então passar por um processo de validação metodológica. A RDC 27/2012 dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos, propondo um estudo principalmente dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limites de quantificação e robustez, além da necessidade da comprovação de estabilidade dos padrões e amostras em diferentes situações (BRASIL, 2012).

2. OBJETIVO

Desenvolver método cromatográfico, com base nos princípios da química verde, para monitorização terapêutica da clozapina e *N*-desmetilclozapina (metabólito ativo) em plasma de pacientes psiquiátricos.

2.1 Objetivos específicos

- Desenvolver método cromatográfico para quantificação de clozapina e seu metabólito ativo com o uso de solventes menos prejudiciais ao meio ambiente;
- Padronizar o método de extração e concentração do analito proveniente de plasma humano.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos Éticos

Este trabalho ocorreu em colaboração com o projeto “Avaliação de variáveis neurobiológicas, psicopatológicas e neuropsicológicas em pacientes com transtornos mentais graves em tratamento no HC-Unicamp” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp, sob o número: 83192918.9.0000.5404. Trata-se de um estudo prospectivo e observacional, realizado em parceria com o Ambulatório de Psiquiatria do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, um hospital terciário, de ensino e de grande porte, localizado na cidade de Campinas, no interior do Estado de São Paulo.

3.2 Materiais - Fármacos e Solventes

- A. Clozapina: Fornecido pelo Laboratório de Farmácia Clínica da Universidade Estadual de Campinas
- B. *N*-Desmetilclozapina: Sigma®, Lote 035M4075V, código 5676/10mg
- C. *N*-Desmetilclozapina D8: Cerilliant®, Lote FN03272003, código D-169-1ML
- D. Água ultrapura: Merck Millipore®, obtida em modelo Direct® – Q 3 UV.
- E. Acetato de Amônio: Sigma®, Lote BCBJ7586V, código 17836-50G
- F. Solventes grau cromatográfico:
 - a. Metanol J.T. Baker®, Lote V14C17, código 9093-03
 - b. Ácido acético J.T. Baker®, Lote A25A21, código 9515-03

- c. Etanol Honeywell Riedel-de Haën™, Lote I2010, código 34964-2.5L
- d. Acetonitrila: Supelco®, Lote JA097330, código 1.00030.4000

3.3. Método bioanalítico

Foram utilizados cromatógrafos Shimadzu® HPLC-UV-VIS e Waters® HPLC ACQUITY QDa, equipados com coluna C18 (5 µm, 4,6 mm x 250 mm) e injetor automático. O comprimento de onda analisado foi de 254 nm (HPLC UV-VIS), e foi busca pelas *m/z* 313 (*N*-Desmetilclozapina), 321 (*N*-Desmetilclozapina D8) e 327 (clozapina) no HPLC-MS. O software Waters Empower 3 foi utilizado para coletar e analisar os dados desse instrumento. A fase móvel foi avaliada com diferentes proporções e combinações dos solventes acetato de amônio 10 mM (ajustado para diferentes pH com ácido acético glacial), acetonitrila (ACN), metanol e etanol, em método isocrático, com vazão de 1000 µL/min, e volume de injeção de 20 ou 50 µL.

3.4 Parte experimental

As amostras utilizadas para padronização do método foram produzidas por meio da adição, em concentrações desejadas segundo cada etapa deste trabalho, dos padrões de clozapina (fármaco), *N*-desmetilclozapina (metabólito ativo) e *N*-desmetilclozapina D8 (padrão interno) em plasma humano branco, ou seja, de pacientes que não eram tratados com o fármaco analisado.

3.4.1 Processamento das amostras

Para o pré-tratamento, foram testados diferentes métodos, sendo eles:

- ACN-MeOH - uma primeira extração com acetonitrila gelada, seguida de outra (no sobrenadante) com metanol gelado (ambos em proporção 1:1 da amostra de plasma);
- 2x ACN 1:1 - extração 1:1 de acetonitrila gelada, mas realizada duas vezes na mesma amostra;
- ACN 2:1 – MeOH - uma primeira extração com acetonitrila gelada 2:1 em relação a amostra, seguida de outra (no sobrenadante) com metanol gelado 1:1 em relação a amostra;
- ACN 2:1 - única extração 2:1 de acetonitrila gelada, em relação a amostra;
- ACN 3:1 - única extração 3:1 de acetonitrila gelada, em relação a amostra.

Para isso, transferiu-se 400 µL da amostra para um tubo Eppendorf ao qual

adicionou-se 400 μL do primeiro solvente gelado (em proporções de acordo com cada proposta acima). O tubo foi então agitado em vórtex por 5 minutos e levado à centrífuga de mesa a 6200 rpm por 10 minutos. Quando realizada uma segunda extração, o sobrenadante era transferido para outro tubo contendo 400 μL do segundo solvente e o processo de agitação e centrifugação repetido. Após esta etapa de desproteinização da amostra, o sobrenadante é transferido e filtrado em filtros de seringa com membrana de poros 0,22 μm , seguindo para etapa de concentração da amostra por evaporação total do solvente e ressuspensão em 100 μL de sistema solvente equivalente à fase móvel.

3.4.2 Curva analítica

Para uma futura validação metodológica, deve-se desenvolver uma curva analítica (em triplicata) que inclua, pelo menos, o branco e mais seis pontos de concentrações distintas adicionadas de padrão interno. As concentrações propostas para a curva foram: zero (branco); 150; 300; 400; 500; 600; 750 e 1000 ng/mL de clozapina e *N*-Desmetilclozapina, sempre acrescidas de 400 ng/mL de *N*-Desmetilclozapina D8 (Padrão Interno) a fim de correção de interferências ao longo do processo. Os pontos propostos para esta curva foram pensados para que compreendessem as concentrações que seriam provavelmente encontradas em amostras de pacientes em uso da clozapina.

Alguns pontos devem ser avaliados como controle de qualidade alto (CQA), médio (CQM) e baixo (CQB). O CQA deve ser 75 a 85% da maior concentração da curva, devendo então ser entre 750 e 850 ng/mL dos padrões avaliados. O CQM deve ser um ponto aproximado do centro da curva, como entre 400 e 500 ng/mL dos padrões. Por fim, o CQB deve ser avaliado em até 3 vezes o limite inferior de quantificação, o menor ponto da curva, representando a concentração de até 450 ng/mL dos padrões.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método foi inicialmente baseado no trabalho de Rosland *et al.* 2007, no qual foram selecionadas as condições cromatográficas utilizadas num primeiro momento deste trabalho. Inicialmente foram testados os sistemas de HPLC UV/VIS (Shimadzu) e HPLC-MS, em modo reverso, e concentrações de clozapina e *N*-Desmetilclozapina maiores do que as utilizadas na literatura para facilitar o estudo

da otimização das condições cromatográficas. Alguns parâmetros podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Condições cromatográficas utilizadas na padronização metodológica em HPLC UV-VIS.

Condições Cromatográficas	
Fase Estacionária	C18 (5 μ m, 4,6 mm x 250 mm)
Vazão	1 mL/min
Volume de Injeção	20 μ L
Tempo de Análise	20 min
Comprimento de Onda	254 nm
Fase Móvel	5:2:3 (tampão acetado pH 5, MeOH e ACN) 53:18:29 (tampão acetado pH 3,5, MeOH e ACN) 58:16:26 (tampão acetado pH 3,5, MeOH e ACN) 63:14:23 (tampão acetado pH 3,5, MeOH e ACN) 31:69 (ACN e tampão acetado pH 3,0) 27:73 (EtOH e tampão acetado pH 2,8)

No trabalho de Rosland et al. (2007) a fase móvel era composta por um sistema solvente triplo, sendo eles: tampão acetato (em pH 5), metanol e ACN, em método isocrático nas proporções 5:2:3. Porém, a coluna C6 *hypersil phenyl* (3 μ m, 2.0 x 150 mm) utilizada por este grupo não estava disponível para uso neste trabalho. Utilizou-se então a coluna C18, o que resultou em um perfil de sobreposição dos picos avaliados nesta etapa (clozapina: 100 μ g/mL e *N*-Desmetilclozapina D8: 50 μ g/mL), como mostra a Figura 2A. Alterando-se o pH para 3,5 e variando-se as proporções de tampão acetato, metanol e ACN, em método isocrático, para 53:18:29, 58:16:26 ou 63:14:23 observou-se maior separação dos picos (clozapina: 50 μ g/mL e *N*-Desmetilclozapina D8: 50 μ g/mL) conforme aumento da porção aquosa do sistema solvente (Figura 2B). Ao aumentar a proporção da fase aquosa, a força de eluição do sistema solvente era diminuída, o que garantiu um maior tempo de retenção da amostra (que passa a interagir por um maior tempo com a fase estacionária) e com isso uma maior resolução dos picos observados.

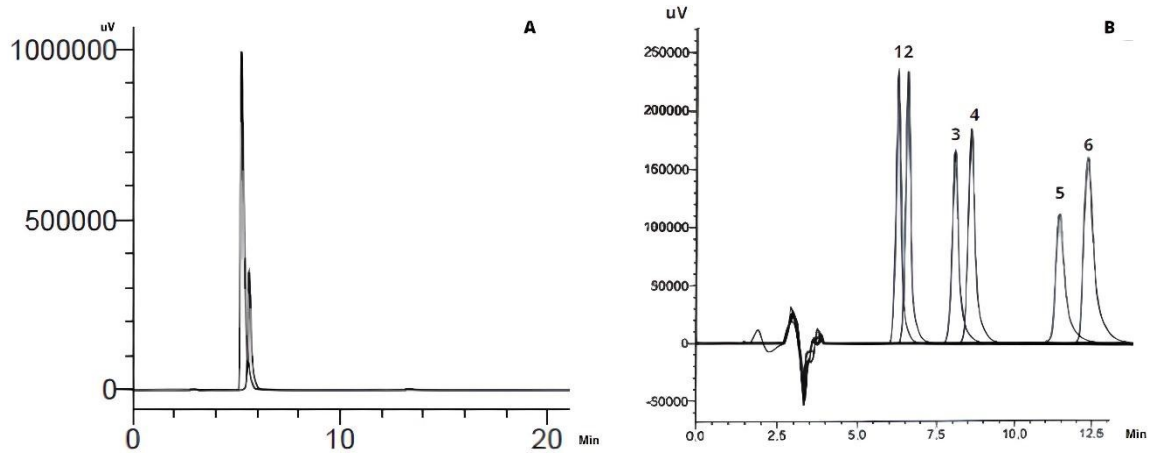


Figura 2. Cromatogramas obtidos em HPLC UV-VS (Shimadzu), em métodos isocráticos. FM em (A) sistema triplo de tampão acetato, metanol e ACN, nas proporções 5:2:3 em pH 5,0, onde o maior pico representa a CLZ (100 µg/mL) e o menor D-CLZ D8 (50 µg/mL), e em (B) cromatogramas sobrepostos para comparação em pH 3,5 nas proporções 53:18:29 (pico 1 e 2), 58:16:26 (picos 3 e 4) e 63:14:23 (picos 5 e 6). *N*-Desmetilclozapina D8 (50 µg/mL) representada nos picos 1, 3 e 5, e a clozapina (50 µg/mL) em 2, 4 e 6.

Devido a relevância da porção aquosa, observada anteriormente com a diminuição da força de eluição do sistema e maior resolução dos picos analisados, foi proposto uma simplificação para sistema solvente duplo, onde foi somente utilizado ACN e tampão acetato (pH 3,0) na proporção 31:69, o que levou a um bom perfil de separação, sem alargamento de bases e com bom tempo de retenção (*N*-Desmetilclozapina D8: 11,5 min e clozapina: 12,4 min) (Figura 3A).

Definido o sistema solvente duplo, objetivou-se a transformação deste para um método de "Química Verde", como sugerem os ODS, especialmente o ODS 14 e 15, os quais se referem à proteção da vida aquática e terrestre. Para tanto, a ACN foi substituída por etanol. Essa alteração promoveu um leve alargamento de banda e maior tempo de retenção (*N*-Desmetilclozapina D8 de 8,09 para 14,16 min, e clozapina de 9,28 para 16,53 min), uma vez que estes solventes possuem diferentes seletividades e forças de eluição, porém as vantagens da utilização de solventes menos danosos ao meio ambiente compensam o prolongamento do tempo de análise (Figura 3B).

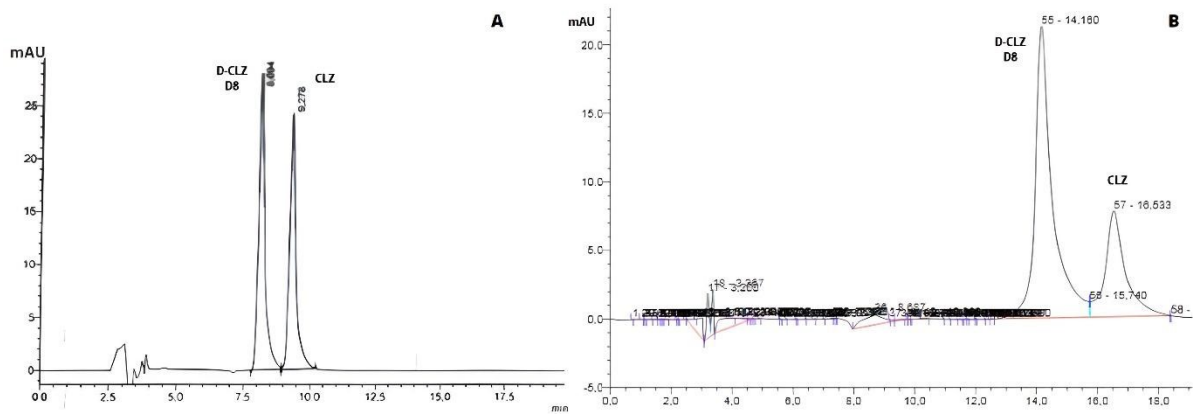


Figura 3. Cromatogramas obtidos em HPLC UV-VS (Shimadzu) nas condições de FM em sistema duplo de ACN (A) ou etanol (B) em tampão acetato, nas proporções 31:69 em pH 3,0 (A), e em pH 2,8 (B) nas proporções 27:73, sendo em (A) ambos os padrões em concentração 16,7 $\mu\text{g/mL}$, e em (B) D-CLZ D8 em 16,7 $\mu\text{g/mL}$ e CLZ em 8,3 $\mu\text{g/mL}$.

Com o método cromatográfico definido, foi então transferido para o equipamento de HPLC-MS (Waters Alliance), o qual possui maior sensibilidade para detectar baixas concentrações, já que diversas moléculas podem ter grupos cromóforos que absorvem um mesmo comprimento de onda (HPLC UV-VIS), problema este contornado quando feito uma análise de busca por m/z de um composto no espectrômetro de massa. Na Figura 4A vemos o perfil apresentado pelos padrões do analito (clozapina e *N*-desmetilclozapina) e do padrão interno (*N*-desmetilclozapina D8). A sobreposição parcial dos picos não apresenta grande impacto neste equipamento, uma vez que, diferentemente do UV/VIS, o detector utilizado é seletivo à razão massa/carga do analito (Clozapina: 327 m/z ; *N*-Desmetilclozapina: 313 m/z ; *N*-Desmetilclozapina D8: 321 m/z), permitindo então a diferenciação.

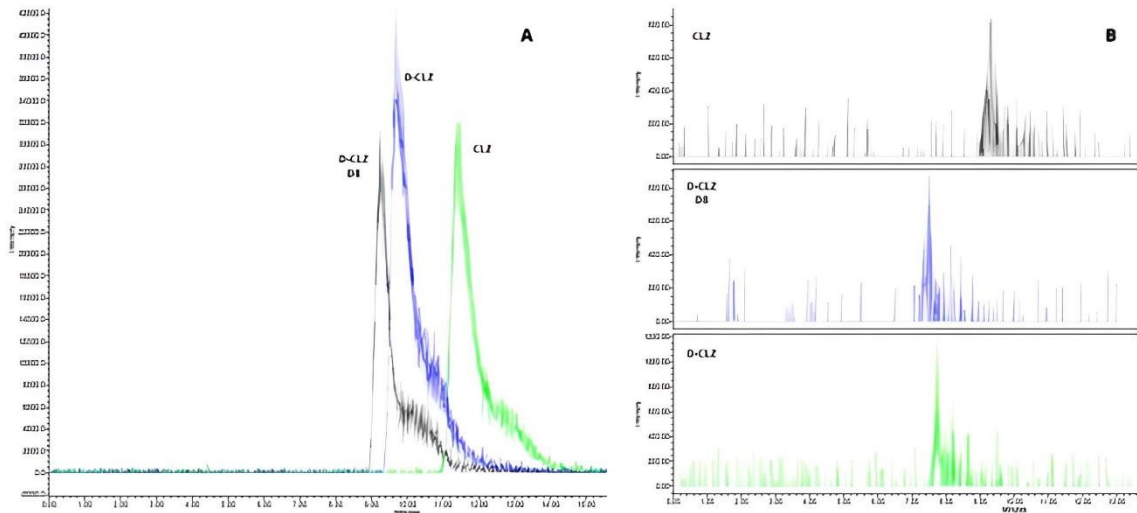


Figura 4. Cromatogramas obtidos em HPLC -MS (Waters alliance) nas condições de FM em sistema duplo de tampão acetato e etanol (73:27, pH 2,8), em concentração 10 µg/mL (A) e 50 ng/mL (B).

Na figura 4A utilizaram-se concentrações muito superiores ao que realmente seria utilizado numa futura curva analítica (10 µg/mL), com o objetivo de identificar mais facilmente a localização dos picos e possíveis interferências. Para testar a sensibilidade do equipamento, analisou-se a menor concentração inicialmente proposta para a curva (50 ng/mL) e, conforme observado na Figura 4B, pode ser verificado que o ruído apresentado pelo equipamento era superior ao permitido para a validação do método, quando comparado à altura dos picos de interesse. Portanto, a partir deste momento foi padronizado um método de concentração da amostra para resolução do problema encontrado, onde um volume inicial de 400 µL de plasma utilizado na extração seria, posteriormente, ressolubilizado em apenas 100 µL de fase móvel.

Como pode-se observar (Figura 5) o método padronizado para concentração da amostra atingiu os objetivos esperados de aumento da área do pico e intensidade do sinal. Deste modo, os picos avaliados encontram-se dentro das especificações da RDC 27/2012, uma vez que esta determina que o ruído mais próximo ao pico de interesse deve representar no máximo 20% da área deste.

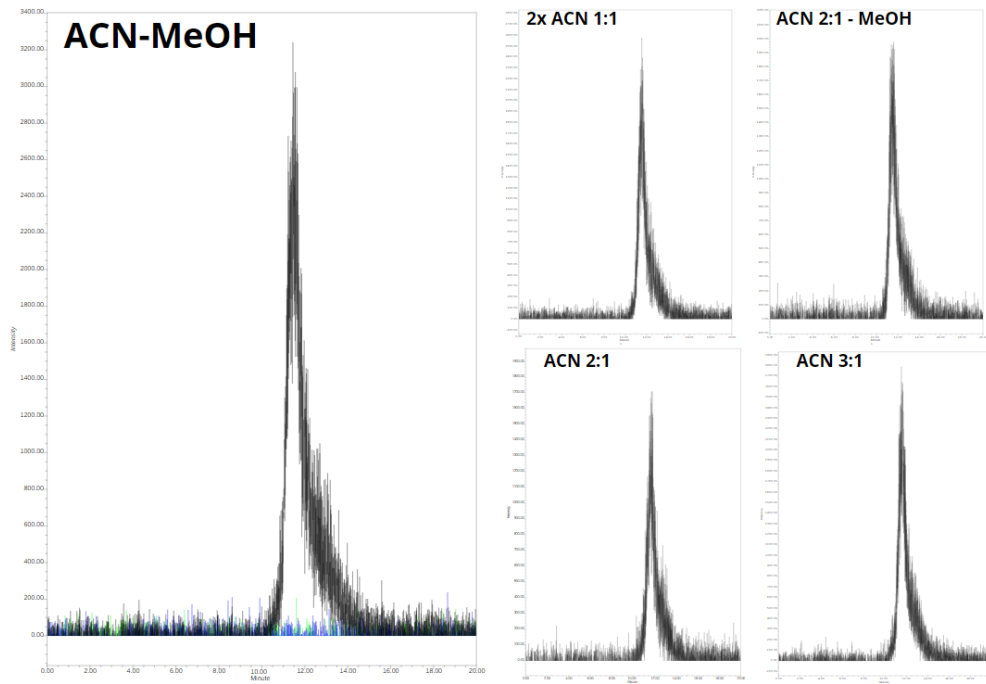


Figura 5. Cromatogramas obtidos em HPLC -MS (Waters alliance) na avaliação de eficiência de diferentes metodologias para extração do fármaco (clozapina) após o processo de concentração das amostras. O pico corresponde a 100 ng/mL.

Além disso, a figura acima nos permite realizar uma comparação entre os diferentes métodos de extração propostos para o preparo da amostra, sendo eles: ACN-MeOH - uma primeira extração com acetonitrila gelada, seguida de outra (no sobrenadante) com metanol gelado (ambos em proporção 1:1 da amostra de plasma); 2x ACN 1:1 - extração 1:1 de acetonitrila gelada, mas realizada duas vezes na mesma amostra; ACN 2:1 – MeOH - uma primeira extração com acetonitrila gelada 2:1 em relação a amostra, seguida de outra (no sobrenadante) com metanol gelado 1:1 em relação a amostra; ACN 2:1 - única extração 2:1 de acetonitrila gelada, em relação a amostra; ACN 3:1 - única extração 3:1 de acetonitrila gelada, em relação a amostra.

Nesta avaliação, evidenciou-se as vantagens do sistema ACN-MeOH frente aos demais, visto que este atingiu altura de pico de aproximadamente 3100 em “unidades de intensidade de sinal”, enquanto os demais testes variaram, aproximadamente, de 1900 a 2500 unidades de Intensidade de sinal (vide anexos para melhor visualização do resultado). Desta forma, verificou-se uma extração mais eficiente do fármaco (clozapina) das amostras de plasma quando realizada a adição

de acetonitrila gelada seguida de metanol gelado, o que garantirá uma maior precisão em uma etapa de quantificação.

5. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados até o presente momento mostram que as condições cromatográficas propostas para melhor atender os princípios da Química Verde, com a não utilização de solventes nocivos à vida terrestre e aquática, apresentam boa resolução para que sejam feitas análises quantitativas de clozapina e *N*-desmetilclozapina em plasma humano. Soma-se a isto, a metodologia efetiva de extração do fármaco das amostras de plasma, bem como uma eficiente técnica de concentração da amostra via evaporação de solvente e ressuspensão do precipitado em menor volume.

A curva analítica proposta para o método possui faixa de abrangência de 150 a 1000 ng/mL, deste modo, a mesma deve se mostrar eficaz na monitorização plasmática do fármaco e seu metabólito ativo, visto que estes encontram-se aproximadamente entre 350 e 600 ng/mL nesta matriz biológica. Apesar de inicialmente aparentar boa faixa de concentrações, faz-se necessário a análise da faixa de linearidade desta.

Porém, deve-se destacar que o presente método deve ser ainda validado, como proposto inicialmente, avaliando parâmetros como seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limites de quantificação e robustez, o que não pode ser realizado dentro do período inicialmente proposto visto que o equipamento se encontra em manutenção, assim como os demais equipamentos de laboratórios que poderiam auxiliar na finalização deste projeto. Com uma futura validação do método, este poderá ser aplicado para a monitorização terapêutica da clozapina e seu metabólito ativo em plasma de pacientes humanos.

REFERÊNCIAS

BECHELLI, Luiz Paulo de C.; CAETANO, Dorgival. Clozapina, um neuroléptico atípico: Propriedades farmacológicas e uso terapêutico. **J. Bras. Psiquiatr**, v. 41, p. 4s-13s, 1992.

BERSANI, Francesco Saverio et al. Fatores que afetam as diferenças interindividuais na resposta à clozapina: uma revisão e relato de caso. **Psicofarmacologia Humana: Clínica e Experimental**, v. 26, n. 3, p. 177-187, 2011.

DICK, Danielle M. et al. Pesquisa de interação gene-ambiente candidato: Reflexões e recomendações. **Perspectives on Psychological Science**, v. 10, n. 1, p. 37-59, 2015.

LAURSEN, Thomas Munk; NORDENTOFT, Merete; MORTENSEN, Preben Bo. Excesso de mortalidade precoce na esquizofrenia. **Annu Rev Clin Psychol**, v. 10, n. 1, p. 425-448, 2014.

LIMA, C. A; et. al. Antipsicóticos. In: PATROCÍNIO, Manoel CA; RODRIGUES, Camila HS; BEZERRA, C. C. SAM; et. al. **Psicofarmacologia e Psiquiatria Geral Para Graduandos e Generalistas**. Fortaleza: Centro Universitário Christus - Unichristus, 2019. p. 65.

MALDANER, Liane; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel CSF. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, p. 1559-1568, 2010.

MEYER, Jonathan M. Farmacoterapia da Psicose e da Mania. In: BRUNTON, Laurence L.; HILAL-DANDAN, Randa; KNOLLMANN, Björn **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 13. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2018. p. 416-452.

PANTELIS, Christos et al. Insights biológicos de 108 loci genéticos associados à esquizofrenia. **Nature**, v. 511, n. 7510, p. 421-427, 2014.

POLANCZYK, G. V. Em busca das origens desenvolvimentais dos transtornos mentais. **Rev. Psiquiat. Rio Grande do Sul**, v. 31, p. 6-12, 2009.

PRAT, Denis e cols. Guia de seleção CHEM21 de solventes clássicos e menos clássicos. **Green Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 288-296, 2016.

QUEIROZ, Sonia CN; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel CSF. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p. 68-76, 2001.

RAGGI, Maria A. et al. Antipsicóticos atípicos: farmacocinética, monitoramento de drogas terapêuticas e interações farmacológicas. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 279-296, 2004.

REGENTHAL, Ralf et al. Níveis de drogas: concentrações séricas / plasmáticas terapêuticas e tóxicas de drogas comuns. **Jornal de monitoramento clínico e computação**, v. 15, n. 7, p. 529-544, 1999.

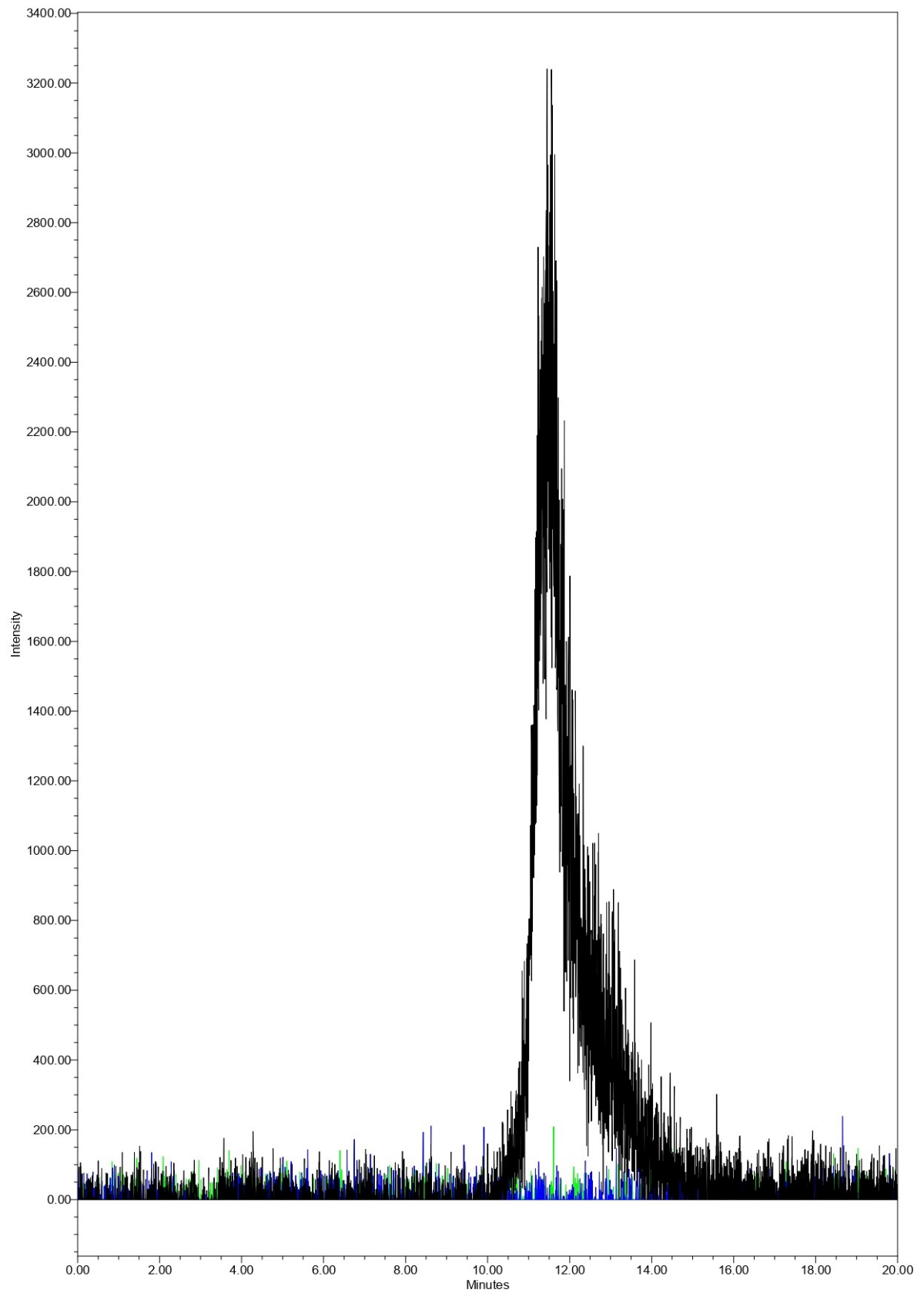
ROSLAND, Micheal et al. Determinação de clozapina e seu metabólito, norclozapina em várias matrizes biológicas usando cromatografia líquida de alta eficiência. **Desenvolvimento de drogas e farmácia industrial**, v. 33, n. 10, p. 1158-1166, 2007.

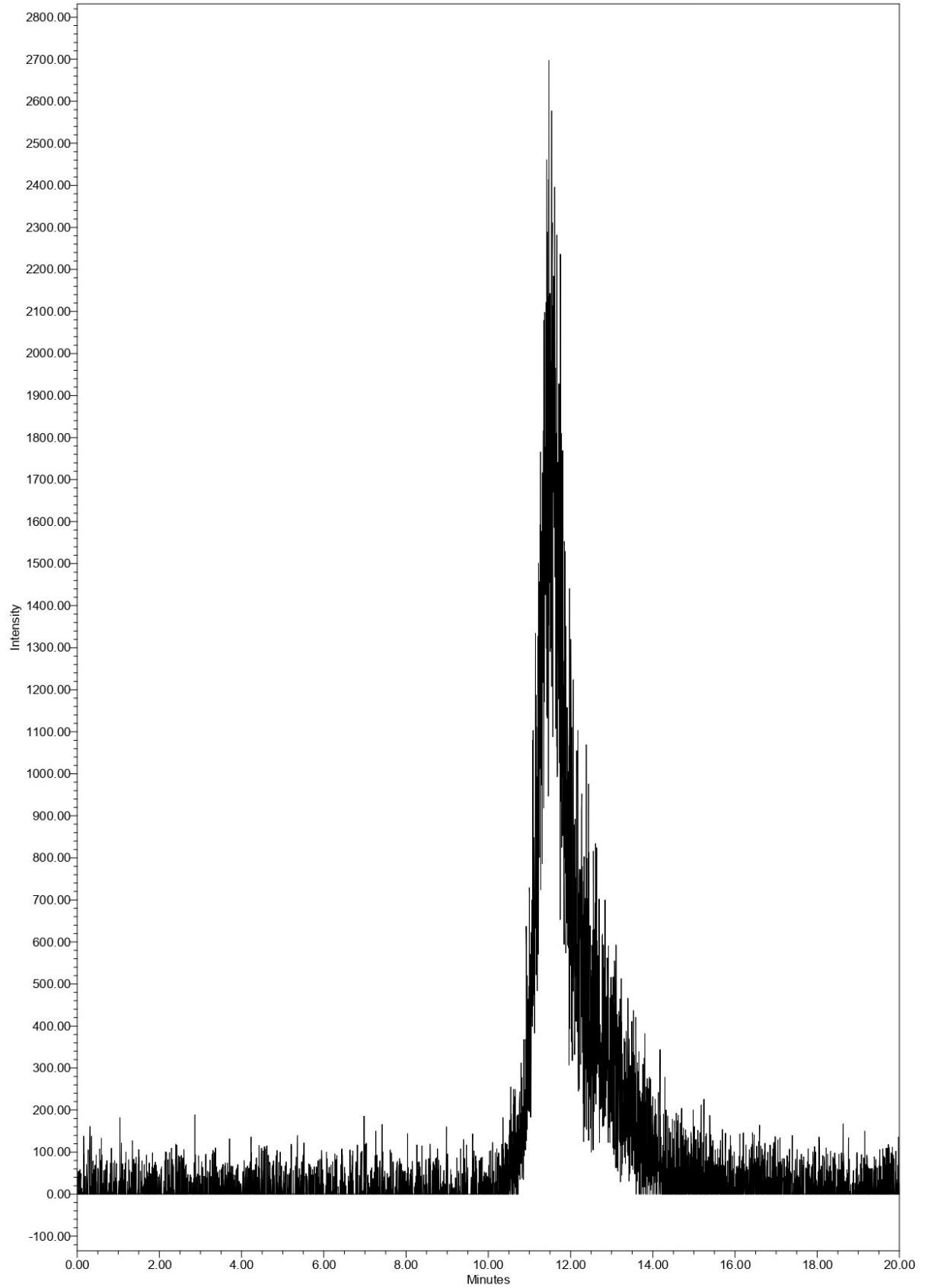
SEDVALL, Goran; FARDE, Lars. Anatomia química do cérebro na esquizofrenia. **The Lancet**, v. 346, n. 8977, p. 743-749, 1995.

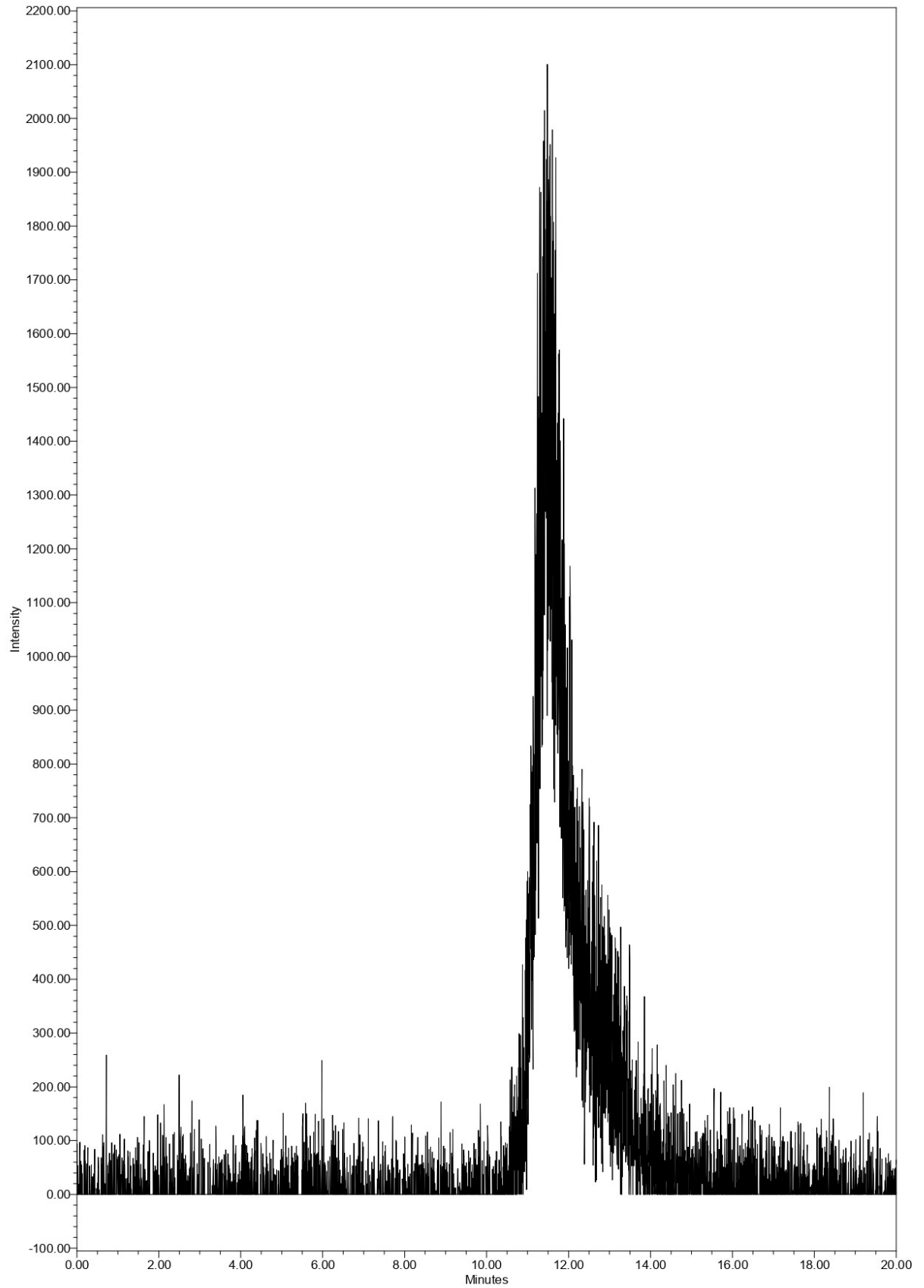
SIROT, Eveline J. et al. Polimorfismos ABCB1 e citocromo P450: farmacogenética clínica da clozapina. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 29, n. 4, p. 319-326, 2009.

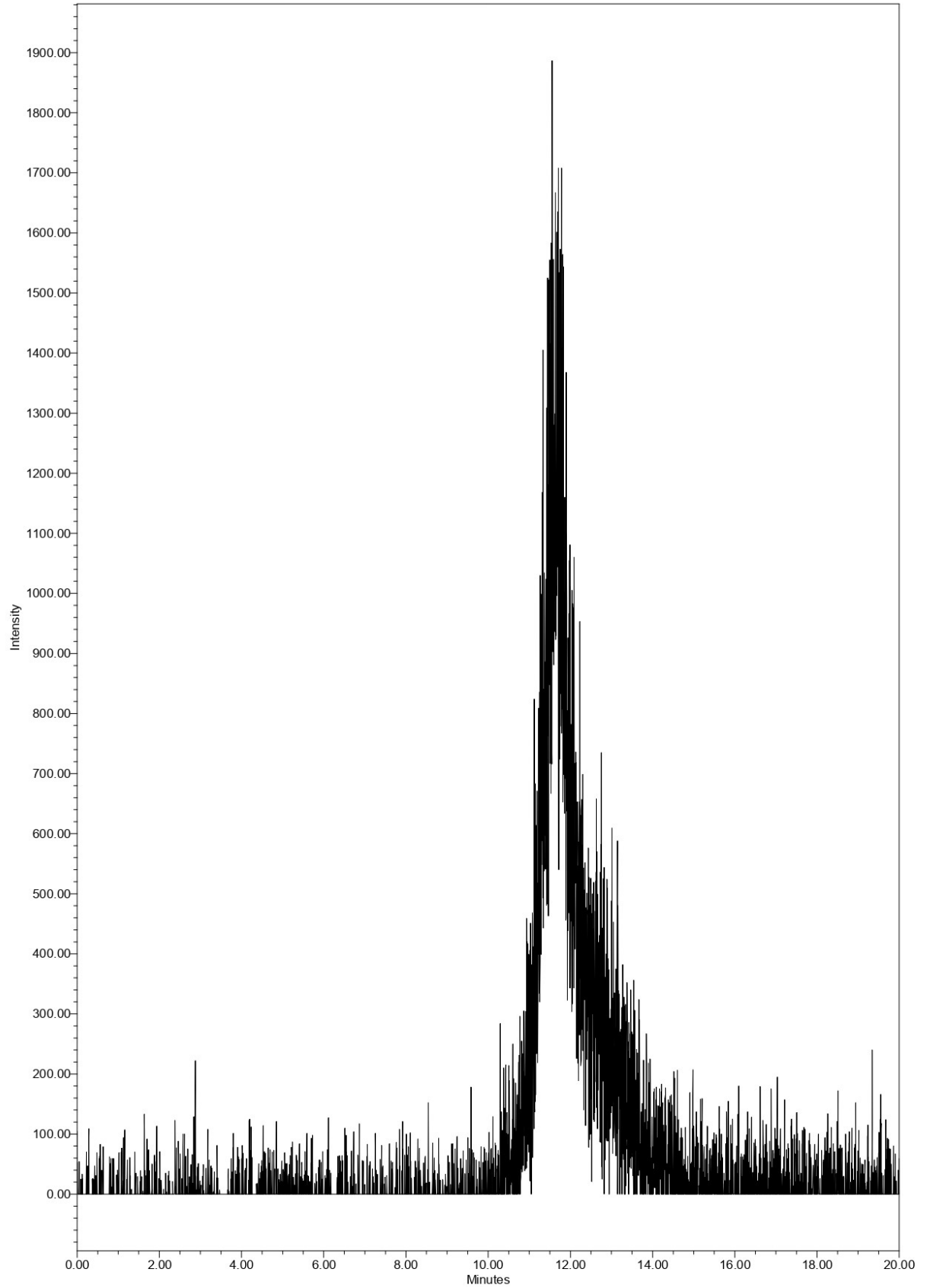
UHER, Rudolf. Interações gene-ambiente em doenças mentais graves. **Fronteiras em psiquiatria**, v. 5, p. 48, 2014.

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.

ANEXOS**1 - ACN-MeOH**

2 – 2X ACN 1:1

3 – ACN 2:1 – MeOH

4 – ACN 2:1

5 – ACN 3:1