



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Noely Camila Tavares Cavalcanti Bedor

Olanzapina: Uma avaliação da bioequivalência de comprimidos 10mg e estudo pré-clínico com desenvolvimento de sondas de microdiálise cerebral

Recife-PE, Fevereiro 2016.

Noely Camila Tavares Cavalcanti Bedor

Olanzapina: Uma avaliação da bioequivalência de comprimidos 10mg e estudo pré-clínico com desenvolvimento de sondas de microdiálise cerebral

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração: Produção e Controle de Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana

Recife-PE, Fevereiro 2016.

Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

B412o

Bedor, Noely Camila Tavares Cavalcanti.

Olanzapina: uma avaliação da bioequivalência de comprimidos 10mg e estudo pré- clínico com desenvolvimento de sondas de microdiálise cerebral / Noely Camila Tavares Cavalcanti Bedor. – 2016.

143 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Davi Pereira de Santana.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2016.
Inclui referências e apêndices.

1. Farmacocinética. 2. Microdiálise. 3. Espectrometria de massas. I. Santana, Davi Pereira de (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2016-066)

Noely Camila Tavares Cavalcanti Bedor

Olanzapina: Uma avaliação da bioequivalência de comprimidos 10mg e estudo pré-clínico com desenvolvimento de sondas de microdiálise cerebral

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE em 29 de fevereiro de 2016, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Banca examinadora constituída pelos seguintes professores:

Presidente e examinador interno: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana (Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Assinatura:_____

Examinador interno: Profa. Dra. Leila Bastos Leal (Universidade Federal do Pernambuco - UFPE)

Assinatura:_____

Examinador interno: Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho (Universidade Federal do Pernambuco - UFPE)

Assinatura:_____

Examinador externo: Profa. Dra. Flávia Patrícia Morais de Medeiros (Faculdade Pernambucana de Saúde – FPS)

Assinatura:_____

Examinador externo: Prof. Dr. Whocely Victor de Castro (Universidade Federal de São João Del Rey - UFSJ)

Assinatura:_____

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Reitor
Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice – Reitor
Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

Diretor de Ciências da Saúde – CCS
Nicodemos Teles de Pontes Filho

Vice – Diretor do Centro de Ciências da Saúde - CCS
Vânia Pinheiro Ramos

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas
Antonio Rodolfo de Faria

Vice – Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas
Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Almir Gonçalves Wanderley

Vice - Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Rafael Matos Ximenes

À Marina

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por concluir mais uma etapa de vida científica e pessoal;

A toda minha família pela torcida, cuidado e apoio neste período de doutorado;

Ao meu marido Danilo Bedor, por estar sempre ao meu lado dando suporte pessoal e científico e pela parceria de vida;

Ao meu orientador Prof. Davi Santana, pela oportunidade trabalho no NUDFAC e pelos ensinamentos científicos;

Agradeço pelo apoio e convivência a todos que fazem o NUDFAC/CP&D: Prof.^a Leila, Alice, Ana Rosa, Anellyse, Ellison, Giovana, Gustavo, Isabelle, Juliana, Karine, Karol, Maira, Thalita, Wellington. A todos que fazem o NUDFAC/analítica: Atamai, Eduardo, Daniel, Diego e Henrique;

Ao Dr. Marcello Solinas pela oportunidade de trabalho no Laboratório de neurociências experimentais e clínica (Inserm U1084) na Universidade de Poitiers no período de doutorado sanduíche;

Ao Prof. William Couet, Profa. Sandrine Marchand, Isabelle Lamarche e Patrice Gobin do laboratório de Pharmacologie des Anti-infectieux (Inserm U1070) da Universidade de Poitiers, pelos ensinamentos e oportunidade de realização de experimentos com os animais no período de doutorado sanduíche;

À empresa parceira Cristália pela doação de amostras e estudo de bioequivalência;

Aos colegas, professores e às funcionárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE;

Aos membros da banca (Profa. Flávia, Profa. Leila, Prof. Lamartine, Prof. Vitor e Prof. Davi);

À FACEPE, pela bolsa de doutorado e à CAPES e Ciências sem Fronteiras, pela bolsa de doutorado sanduíche;

A todos que colaboraram para o desenvolvimento das várias etapas deste trabalho. Muito Obrigada!!!

“Quem quer que você seja, seja alguém bom”.

Abraham Lincoln

RESUMO

A olanzapina é um antipsicótico atípico cujo efeito colateral ganho de peso pode ser a causa de não adesão ao tratamento. Não se sabe qual o mecanismo fisiológico que explicaria essa relação, daí a necessidade de pesquisas na área da farmacocinética (PK) e da farmacodinâmica (PD). Assim, o objetivo da tese buscou entender melhor a farmacocinética da OLZ através de estudos em humanos e animal, visando otimização na posologia, empregando correlações de PK/PD. Foi realizado um estudo de bioequivalência utilizando comprimidos teste e referência 10 mg. Em seguida, para evidenciar possíveis variações em alguns parâmetros de PK e buscar dados de PD, realizou-se um estudo de PK plasmática e microdiálise cerebral (MD) em animais. Paralelamente, foram preparadas sondas de MD em laboratório e realizada uma comparação com as sondas comerciais, através de diálise e retrodiálise *in vitro*. Para o estudo com MD, foi realizada a cirurgia estereotáxica para implantação da sonda e punção da artéria e veia femoral, para administração da dose e coleta de amostras plasmáticas. O estudo de bioequivalência foi do tipo aberto, aleatório, cruzado 2 x 2, com 28 voluntários sadios. O método de quantificação da OLZ, em plasma humano por CL-EM/EM, mostrou-se simples, rápido e sensível com o tempo de corrida de 2 min. Os parâmetros farmacocinéticos em humanos $C_{\text{máx}}$, $T_{\text{máx}}$, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ obtidos para a formulação teste e referência foram de $11,47 \pm 3,65$; $12,50 \pm 3,73$ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; $4,50 \pm 1,85$; $4,30 \pm 2,37$ h; $240,97 \pm 78,46$ e $283,12 \pm 94,84$ $\text{ng} \cdot (\text{mL} \cdot \text{h})^{-1}$, respectivamente, sendo os medicamentos bioequivalentes. As amostras de plasma de animais foram analisadas por CL-EM/EM e de acordo com disposição cinética, o modelo bicompartimental foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais. Os parâmetros farmacocinéticos obtidos através de Excel, Winnolin e Pksolver foram considerados próximos. O local de inserção da sonda foi confirmado através de histologia. Os resultados da recuperação por diálise e retrodiálise para as sondas comercial e de laboratório foram $19,27 \pm 10,11$; $19,42\% \pm 6,54$; $23,06 \pm 2,36$; $24,59 \pm 3,14$, respectivamente. Portanto, as mesmas podem ser intercambiáveis. Por fim, essa tese colaborou com a formação de recursos humanos para inserir no grupo de pesquisa uma técnica pouco utilizada no Brasil, microdiálise cerebral, além de publicação de artigo em periódico internacional.

Palavras chaves: Farmacocinética. Microdiálise. Espectrometria de massas.

ABSTRACT

The olanzapine is an atypical antipsychotic, which confers effects as weight gain, which may be the cause of non-compliance. It is not known what the physiological mechanism that is related to weight gain, hence it is necessary improve the research in pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD). The aim of the thesis sought to better understand the pharmacokinetics of OLZ through studies in humans and animals, aimed at optimizing the dosage regimen using PK / PD correlation. It conducted a bioequivalence study using test and reference tablets 10 mg. Then, to understand possible variations in some parameters PK and PD data fetch, it was performed a plasma PK study and brain microdialysis (MD) in animals. At the same time, MD probes were prepared at the laboratory and compared with commercial probe by dialysis and retrodialysis *in vitro*. For the MD study, stereotaxic surgery was performed to implant the MD probe and puncture of the femoral artery and vein was performed to dosing and collecting of plasma samples. The bioequivalence study was open, randomized, crossover 2x2 with 28 healthy participants. The method of quantification of OLZ in human plasma by LC-MS/MS developed and validated is simple, fast and sensitive with analysis time (2 min). The human pharmacokinetic parameters C_{max} , T_{max} , AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$ obtained for the test and reference formulation were de 11.47 ± 3.65 , $12.50 \pm 3.73 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 4.50 ± 1.85 , $4.30 \pm 2.37 \text{ h}$, 240.97 ± 78.46 e $283.12 \pm 94.84 \text{ ng} \cdot (\text{mL} \cdot \text{h})^{-1}$, considering the formulations bioequivalent. Plasma samples of animals were analyzed by LC-MS / MS and according to kinetic disposition, the two-compartment model was the best fit to the experimental data. Pharmacokinetic parameters obtained from Excel, Winnolin and Pksolver were considered approximate. The insertion of the probe into the striatum of the brain of animals was confirmed by histological sections. The results for recovery by dialysis and retrodialysis for commercial and laboratory probes were $19.27\% \pm 10.11$; $19.42\% \pm 6.54$; $23.06\% \pm 2.36$; $24.59\% \pm 3.14$. Therefore, they can be interchangeable. Finally, this thesis collaborated with the training of human resources to insert in the research group, a technique not widely used in Brazil, besides publishing scientific paper in an international journal.

Keywords: Pharmacokinetics. Microdialysis. Mass Spectrometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 - Estrutura química da olanzapina.....	27
Figura 2 - Esquema de uma sonda de microdiálise.	32
Figura 3 - Relação entre farmacocinética e farmacodinâmica.	36
Figura 4 - Representação do modelo monocompartimental após administração intra e extravascular.....	39
Figura 5 - Representação do modelo bicompartimental após administração intra e extravascular.....	40
Figura 6 - Processo de desenvolvimento de novos medicamentos e a relação farmacocinética-farmacodinâmica.....	42
Figura 7 - Sondas de microdiálise nos formatos concêntrica (A), linear (B) e shunt (C).....	46
Figura 8 - Estrutura química da olanzapina (A) e olanzapina D3(B).....	48
Figura 9 - Esquema de confecção das sondas em laboratório.....	50
Figura 10 - Representação esquemática da configuração do sistema CL-EM/EM no experimento de efeito matriz.	52
Figura 11 - Esquema para recuperação por diálise e retrodiálise.	53
Figura 12 - Design uma sonda de microdiálise feita em laboratório (A) e uma sonda comercial CMA (B).	56
Figura 13 - Cromatogramas do dialisado branco (A) e dialisado branco fortificado com 15 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ do PI (B).	58
Figura 14 - Curva analítica na faixa de 0,625 a 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	59
Figura 15 - Cromatograma ilustrativo do efeito matriz.	60
Figura 16 - Curva de nível obtida para o modelo.	64
Figura 17 - Gráfico de superfície de resposta para o modelo.....	65
Figura 18 - Cateter para inserção em veia e artéria femoral.	74
Figura 19 - Incisão abdominal no animal para exposição de veia e artéria femoral e inserção de cateter.....	81
Figura 20 - Perfuração na região dorsal para passagem dos cateteres inseridos na veia e artéria femoral esquerda.	81
Figura 21 - Cirurgia de estereotaxia mostrando pontos de hemorragia e perfuração de tamanho inadequado para inserção da cânula guia.	83
Figura 22 - Tecido cerebral com coordenadas incorretas na inserção da cânula guia.	83
Figura 23 - Representação esquemática do modelo bicompartimental.....	85

Figura 24 - Perfil farmacocinético da olanzapina em ratos após administração intravenosa de dose 3 mg.kg ⁻¹	86
Figura 25 - Representação gráfica do logaritmo das concentrações plasmáticas, das concentrações extrapoladas (□) e dos resíduos (Δ).	87
Figura 26 - Perfil farmacocinético da olanzapina em ratos após administração intravenosa de dose 3 mg.kg ⁻¹ utilizando o PKsolver.	88
Figura 27 - Representação gráfica do logaritmo das concentrações plasmáticas.	88
Figura 28 - Gráfico dos resíduos utilizando o PKsolver (concentração experimental – concentração prevista pelo modelo).....	88
Figura 29 - Experimento de microdialise	90
Figura 30 - Procedimento de secção coronal.....	91
Figura 31 - Cortes histológicos cerebrais sem coloração.....	91
Figura 32 - Fotografias de uma lâmina em microscópio ótico. A porção alaranjada mostra o local de inserção da sonda.	92
Figura 33 - Cromatograma ilustrando a análise da OLZ e do P.I. extraídos do plasma	111
Figura 34 - Íon produto ESI + da olanzapina (A), obtido utilizando o espectrômetro Triplo Quadrupolo.....	112
Figura 35 - Íon produto ESI + da olanzapina (A), obtido utilizando o espectrômetro Triplo Quadrupolo Cromatogramas de plasma branco (A), plasma branco fortificado com 1 ng·mL ⁻¹ padrão de OLZ (B) e plasma branco fortificado com 200 ng·mL ⁻¹ do PI. (C).....	115
Figura 36 - Perfil da concentração plasmática x tempo de 28 participantes da pesquisa saudáveis após a administração de dose única oral de 10 mg de olanzapina (produto teste versus referência).	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sintomas positivos e negativos da esquizofrenia.	24
Tabela 2 - Planejamento composto central de face centrada utilizado na etapa de recuperação <i>in vitro</i> . Entre parênteses estão os níveis dos fatores codificados.	54
Tabela 3 - Características da sonda comercial e de laboratório	55
Tabela 4 - Resultados do planejamento composto central	61
Tabela 5 - Coeficientes do modelo ajustado para resposta.	62
Tabela 6 - ANOVA do modelo polinomial de segunda ordem inicial.	62
Tabela 7 - Coeficientes do modelo ajustado para resposta.	63
Tabela 8 - ANOVA do modelo polinomial de segunda ordem ajustado.	64
Tabela 9 - Protocolo de Nissl para coloração com cresil violeta.....	80
Tabela 10 - Concentrações de olanzapina obtidas em plasma de rato.	84
Tabela 11 - Dados experimentais e previstos pelo modelo farmacocinético em plasma de ratos (n=3).....	87
Tabela 12 - Comparação dos valores dos parâmetros farmacocinéticos utilizando as ferramentas estatísticas Excel e Pksolver.....	89
Tabela 13 - Comparação de métodos publicados para quantificação da olanzapina.	97
Tabela 14 - Exatidão e precisão da linearidade do método de validação.....	116
Tabela 15 - Resultados de precisão e exatidão do método de validação	117
Tabela 16 - Parâmetros farmacocinéticos e análise estatística dos produtos teste e referência no corrente estudo e outros métodos publicados	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIC - *Aikake informtion criterion*

ANOVA - Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI – Ionização química à pressão atmosférica

ASC – Área sob a curva

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CEAF - Componente Especializado da Assistência Farmacêutica

C_{máx} - Concentração máxima no plasma

CL-EM/EM - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CQA – Controle de qualidade de alta concentração

CQB – Controle de qualidade de baixa concentração

CQM – Controle de qualidade de média concentração

DPR - Desvio padrão relativo

EFS – Extração em fase sólida

ELL – Extração líquido-líquido

EM – Efeito matriz

EP – Eficiência de processo

ESI – Ionização *electrospray*

EPR – Erro padrão relativo

FDA – *Food and Drug administration*

FEP - tetrafluoroetileno e hexafluoropropileno

HDL - *High Density Lipoprotein*

IC – Intervalo de confiança

KCl – Cloreto de potássio

Lafepe – Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco

LIQ - Limite Inferior de Quantificação

MAT – Tempo de absorção médio

MD – Microdiálise

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

MRM - Monitoramento de reações múltiplas

MTBE - Éter metil terc-butílico

NaCl – Cloreto de sódio

NUDFAC - Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético

NTs – neurotransmissores

OLZ – Olanzapina

OMS – Organização Mundial de Saúde

PI – Padrão interno

RE – Recuperação

RENAME - Relação Nacional de Medicamentos do Componente Básico da Assistência Farmacêutica

RPM – Rotação por minuto

SCB -Sistema de classificação biofarmacêutica

SUS - Sistema Único de Saúde

TCLE - termo de consentimento livre e esclarecido

TGI - trato gastrointestinal

T_{máx} - Tempo necessário para atingir a concentração máxima

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem	seg – segundo
mg – miligrama	N ₂ – nitrogênio
g – grama	L – litro
mL – mililitro	≥ - maior ou igual a que
°C – grau celsius	≤ - menor ou igual a que
ng - nanograma	R ² - coeficiente de determinação
h – hora	n ^o – número
pg – picograma	UI – unidade internacional
µL microlitro	kV -千伏
min – minuto	V - volts
Da – dalton	< - menor que
pH – potencial hidrogeniônico	M – masculino
pKa – constante de acidez	F – feminino
K _a - constantes da velocidade de absorção	
K ₁₂ , K ₂₁ - constantes da velocidade de distribuição	
K _e e K ₁₀ - constantes da velocidade de eliminação	
Ln – logaritmo natural	
> - maior que	
kDa – quilodalton	
µm – micrômetro	
mm – milímetro	
H ₂ O – água	
mM – milimolar	
cm – centímetro	
m/z – relação massa/carga	
v/v – relação volume/volume	
log P – coeficiente de partição	
t _{1/2} – meia vida de eliminação	
∞ - infinito	

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3 REFERENCIAL TEÓRICO	22
3.1 DOENÇA - ESQUIZOFRENIA	22
3.2 OLANZAPINA.....	26
3.2.1 <i>Características químicas</i>	27
3.2.2 <i>Propriedades farmacodinâmicas</i>	27
3.2.3 <i>Propriedades toxicológicas</i>	28
3.2.4 <i>Propriedades farmacocinéticas</i>	29
3.3 MICRODIÁLISE	30
3.4 FARMACOCINÉTICA	35
3.4.1 <i>Modelos compartimentais</i>	38
3.4.2 <i>Ordem cinética</i>	41
3.4.3 <i>Farmacocinética no desenvolvimento de medicamentos</i>	41
3.4.4 <i>Bioequivalência</i>	42
4 PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DE SONDAS DE MICRODIÁLISE	46
4.1 INTRODUÇÃO	46
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.2.1 <i>Substâncias químicas e reagentes</i>	48
4.2.2 <i>Material para confecção de sondas</i>	49
4.2.3 <i>Equipamentos</i>	49
4.2.4 <i>Confecção de sondas</i>	49
4.2.5 <i>Método de quantificação da olanzapina</i>	50
4.2.6 <i>Recuperação in vitro das sondas de microdiálise</i>	52
4.2.7 <i>Adsorção aos tubos plásticos da microdiálise</i>	55
4.2.8 <i>Análise estatística</i>	55
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.3.1 <i>Confecção de sondas</i>	55
4.3.2 <i>Método de quantificação da olanzapina</i>	57
4.3.3 <i>Recuperação in vitro das sondas de microdiálise</i>	60
4.3.4 <i>Adsorção aos tubos plásticos da microdiálise</i>	67
4.4 CONCLUSÕES	67
4.5 REFERÊNCIAS.....	68

5 FARMACOCINÉTICA PLASMÁTICA DA OLANZAPINA E MICRODIÁLISE CEREBRAL	71
5.1 INTRODUÇÃO	71
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	72
5.2.1 <i>Substâncias químicas, solventes e reagentes</i>	72
5.2.2 <i>Material</i>	72
5.2.3 <i>Equipamentos</i>	73
5.2.4 <i>Animais</i>	73
5.2.5 <i>Cirurgia para inserção de cateter em veia e artéria femoral</i>	74
5.2.6 <i>Cirurgia de estereotaxia para implantação da sonda de microdiálise</i>	75
5.2.7 <i>Avaliação Farmacocinética</i>	75
5.2.8 <i>Método de quantificação da olanzapina em plasma de ratos</i>	78
5.2.9 <i>Microdiálise cerebral</i>	79
5.2.10 <i>Histologia cerebral</i>	79
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
5.3.1 <i>Cirurgia para inserção de cateter em veia e artéria femoral</i>	80
5.3.2 <i>Cirurgia de estereotaxia para implantação da sonda de microdiálise</i>	82
5.3.4 <i>Avaliação Farmacocinética</i>	83
5.3.5 <i>Método de quantificação da olanzapina em plasma de ratos</i>	84
5.3.6 <i>Farmacocinética plasmática</i>	84
5.3.7 <i>Microdiálise cerebral</i>	89
5.3.8 <i>Histologia cerebral</i>	90
5.4 CONCLUSÕES	92
5.5 REFERÊNCIAS.....	93
6 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE OLANZAPINA EM PLASMA HUMANO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS E APLICAÇÃO EM ESTUDO FARMACOCINÉTICO	96
6.1 INTRODUÇÃO	96
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	101
6.2.1 <i>Substâncias químicas</i>	101
6.2.2 <i>Equipamentos</i>	101
6.2.3 <i>Método de quantificação da olanzapina em plasma humano</i>	101
6.2.3.1 <i>Condições cromatográficas</i>	101
6.2.4 <i>Estudo clínico</i>	107
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	110
6.3.1 <i>Método de quantificação da olanzapina em plasma humano</i>	110
6.3.2 <i>Método de validação</i>	114
6.3.3 <i>Aplicação do Método – Estudo Farmacocinético</i>	118

6.4 CONCLUSÕES	122
6.5 REFERÊNCIAS.....	122
7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	127
REFERÊNCIAS	128
APÊNDICE A - THE DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR QUANTIFYING OLANZAPINE IN HUMAN PLASMA BY LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY AND ITS APPLICATION IN A PHARMACOKINETIC STUDY	135

1 INTRODUÇÃO

A esquizofrenia é uma doença que atinge cerca de 1% da população mundial com uma incidência no Brasil que acomete quatro em cada dez mil adultos (BEHENCK et al., 2011). Sua etiologia é indefinida, porém, há hipóteses que relacionam o estímulo ou inibição do funcionamento de receptores dos neurotransmissores, principalmente dopaminérgicos e serotoninérgicos. Seus sintomas são divididos em positivos (delírios e alucinações) e negativos (perda de comunicação, comportamento antisocial, deficiência cognitiva) (COSTA; ANDRADE, 2011).

O tratamento terapêutico é realizado com medicamentos antipsicóticos típicos e atípicos. Os típicos são eficazes nos sintomas positivos e provocam efeitos adversos extrapiramidais e os atípicos são eficazes para os sintomas negativos, mas sem efeitos extrapiramidais. No entanto, os atípicos ocasionam o ganho de peso, doenças cardiovasculares e metabólicas, que são consideradas motivos de não adesão ao tratamento (LEUNG et al., 2014).

A olanzapina é um antipsicótico atípico disponível no mercado nas concentrações de 2,5, 5 e 10 mg e apresenta o maior potencial para ganho de peso dentre os outros atípicos (FONSECA, 2009; MELLO, 2009; POYUROVSKY et al., 2003). No entanto, não se sabe qual o mecanismo fisiopatológico que se relaciona com o ganho de peso. Daí a necessidade de pesquisas na área da farmacocinética e da farmacodinâmica para conferir um maior entendimento sobre a influência das concentrações plasmáticas atingidas após uma determinada dose do fármaco, a duração da sua ação farmacológica e seu potencial toxicológico.

A relação farmacocinética-farmacodinâmica (concentração-resposta) vem sendo utilizada pelas indústrias farmacêuticas na adaptação de doses e regimes posológicos, no desenvolvimento de novos fármacos e em estudo de biodisponibilidade, bioequivalência, bioisenção e equivalência terapêutica de medicamentos genéricos e similares. Além da capacidade de predizer a farmacocinética humana utilizando modelos animais (STORPIRTIS et al., 2011).

Atualmente, a técnica de microdiálise cerebral tem sido empregada no estudo de doenças psiquiátricas (esquizofrenia e déficit de atenção, por exemplo), proporcionando maior conhecimento sobre a etiologia e a ação terapêutica dos antipsicóticos, pois é largamente utilizada no monitoramento da concentração de neurotransmissores (DARVESH et al., 2011).

A técnica consiste na inserção de uma sonda de diálise, que possui uma membrana semipermeável, numa região específica do cérebro, através de cirurgia estereotáxica, a qual necessita de treinamento prévio devido à detalhes inerentes ao equipamento e à manipulação correta do animal. A sonda é perfundida com fluxo constante de líquido de perfusão que possibilita difusão passiva de substâncias (BASTOS et al., 2013). O baixo fluxo de líquido de perfusão confere um volume de amostra reduzido, necessitando de tratamento prévio e utilização de método muito sensível para quantificação dos analitos nas amostras (NANDI; LUNTE, 2009). Para aquisição de sondas, o custo é alto, mas há alternativas para confecção de sondas em laboratório, utilizando material de baixo custo e fácil acesso, estando sua eficiência de recuperação semelhante às sondas comerciais (LIETSCHÉ et al., 2014).

A farmacocinética estuda os processos que o fármaco sofre no organismo e a relação das concentrações atingidas com o tempo (LABOUNE, 1993). Modelos matemáticos são propostos para auxiliar na interpretação do que ocorre com o fármaco fisiologicamente, utilizando equações que permitem descrever a evolução temporal das concentrações plasmáticas do fármaco no organismo (LEBLANC et al., 2000).

No Brasil, os antipsicóticos são disponibilizados pelo SUS e fazem parte do Componente Especializado da Assistência Farmacêutica, que garante acesso gratuito a medicamentos e estão presentes na Relação Nacional de Medicamentos do Componente Básico da Assistência Farmacêutica (BRASIL, 2012a; BRASIL, 2013). Segundo o Ministério da Saúde, R\$ 220 milhões são gastos pelo governo federal para disponibilização desses medicamentos (BRASIL, 2009).

O custo de desenvolvimento de um medicamento inovador é alto. O genérico é uma alternativa para disponibilização de medicamentos que pode ser intercambiável com o inovador, mas de custos bem menores. O estudo de bioequivalência, atualmente, é o método reconhecido pelas agências reguladoras como sendo capaz de avaliar uma formulação teste em relação a uma formulação de referência, que se consideradas bioequivalentes, permite a disponibilização do genérico no mercado (MOREIRA, 2014; STORPIRTIS et al., 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo foi realizar avaliação farmacocinética da olanzapina em ratos, além de um estudo de biodisponibilidade/bioequivalência de comprimidos de olanzapina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver sondas de microdiálise cerebral em laboratório;
- Realizar uma comparação de eficiência de recuperação entre sonda de laboratório e sonda comercial;
- Desenvolver e validar metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CL-EM/EM) para quantificação da olanzapina em líquido de perfusão;
- Desenvolver habilidade de realizar cirurgia de estereotaxia cerebral para implantação de sondas de microdiálise cerebral em ratos;
- Avaliar a farmacocinética plasmática da olanzapina com administração intravenosa em ratos e modelagem farmacocinética;
- Desenvolver e validar metodologia bioanalítica por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CL-EM/EM) para quantificação da olanzapina em plasma humano;
- Realizar estudo de biodisponibilidade/bioequivalência de um medicamento teste com o medicamento de referência.

Referencial teórico

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Doença - Esquizofrenia

A esquizofrenia é uma doença que tem origem nos tempos da antiguidade e o termo deriva do grego (*schizo*: divisão e *phrenos*: mente) e significa “mente partida”. Foi descrita, inicialmente, por Kraepelin, em 1893, no livro *dementia praecox*. Em seguida, em 1911, Bleuler, psiquiatra suíço, inseriu o termo “esquizofrenia” que indica a ruptura entre pensamento, emoção e comportamento nos pacientes (MOSKOWITZ; HEIM, 2011). Ambos continuaram sendo estudados por anos. E em 1948, o psiquiatra alemão, Kurt Schneider, afirmou que o diagnóstico dependia de sintomas como audição de vozes, ausência de pensamentos, delírios, determinados atos de volição, afeto e ânsias automatizadas (OLIVEIRA 2010a; SILVA, 2006).

A etiologia da doença não é totalmente definida, podendo ser de origem genética ou agravada por fatores ambientais. Aparece normalmente no período entre o final da adolescência e começo da vida adulta, sem distinção de sexo (FERREIRA et al., 2007). E afeta as funções emocionais e cognitivas, com distorções de pensamentos e de percepções, dificuldade de comunicação e comportamento desordenado (ARJI, 2010; VARGAS; SANTOS, 2011).

É considerada um transtorno psiquiátrico decorrente da hiperatividade do neurotransmissor dopamina, mesmo existindo várias outras hipóteses bioquímicas relacionadas à sua origem, como a hipótese serotoninérgica e glutaminérgica (SILVA, 2006). Essas hipóteses são baseadas na eficácia dos antipsicóticos com capacidade de atuar contra sintomas específicos da doença estimulando ou inibindo o funcionamento de receptores dos neurotransmissores. A hipótese dopaminérgica é a mais estudada e aceita atualmente (ARJI, 2010; COSTA; ANDRADE, 2011).

A hipótese dopaminérgica afirma que os sintomas positivos da doença são decorrentes de uma hiperatividade da dopamina, mediada pelos receptores dopaminérgicos (D_2) da via dopaminérgica mesolímbica. É constatada pela ação de drogas como a anfetamina, que é psicoestimulante, cuja administração em doses elevadas e consecutivas em indivíduos saudáveis, causaria uma psicose tóxica de sintomas semelhantes aos da esquizofrenia, ocasionado pelo aumento da liberação da dopamina (TORT, 2005). E essa hipótese ainda pode ser baseada na ação de antipsicóticos antagonistas dopaminérgicos, principalmente no

receptor do tipo D₂, com eficácia terapêutica relacionada aos sintomas positivos da doença (COSTA; ANDRADE, 2011).

A hipótese serotoninérgica é baseada na eficácia terapêutica de antipsicóticos do tipo atípicos, que possuem ação nos receptores 5-HT₂. E a hipótese glutaminérgica diz respeito à ação de drogas antagonistas dos receptores de glutamato, que também produzem sintomas semelhantes aos da esquizofrenia em indivíduos saudáveis (ARJI, 2010). Apesar da existência de hipóteses que poderiam explicar a sua etiologia, nenhuma fornece, de forma satisfatória, explicações às questões que existem em torno da esquizofrenia, mantendo, assim, a ideia de que é uma doença decorrente de inúmeros fatores (FONSECA, 2009).

Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV, 1995), a esquizofrenia apresenta 5 subtipos, sendo classificados de acordo com a presença dos sintomas durante os diagnósticos e tratamento. Classifica-se como tipo paranóide (presença de delírios e alucinações auditivas), tipo desorganizado (presença de discursos e comportamentos desorganizados), tipo catatônico (presença de perturbação psicomotora), tipo indiferenciado (pacientes que não se encaixam nos tipos) e tipo residual (pacientes que possuem perturbação esquizofrênica, mas, com ausência de alguns sintomas específicos).

Os sintomas específicos dessa patologia são divididos em sintomas positivos e negativos e estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Sintomas positivos e negativos da esquizofrenia.

Sintomas positivos da esquizofrenia	
Alucinações	São mais comuns os comandos auditivo (escutar ordem para realizar ações) e olfativo. Menos comuns são os comandos visuais e táteis
Delírios	Podem ser relacionados à perseguição, crenças religiosas, grandiosidades, inserção ou perda de pensamentos
Desordem de pensamento	Discurso desorganizado, modificações de tópicos e palavras sem sentido
Passividade	Emoções, movimentos corporais ou sensações são experimentados como sendo causada por agente externo
Sintomas negativos da esquizofrenia	
Embotamento afetivo	Dificuldade em expressar emoções e sentimentos
Alogia	Pobreza de discurso e inabilidade de comunicação
Avoliação	Inabilidade de fazer algo. Algumas vezes pode ser interpretado como preguiça, mas faz parte da doença
Anedonia	Incapacidade de sentir prazer no que faz

Fonte: SHIN et al., 2014.

Estudos de incidência dessa patologia são difíceis de realizar. A principal conclusão da Organização Mundial de Saúde (OMS) sobre incidência mostra uma faixa estreita entre 0,1 e 0,4 por 1000 habitantes e a prevalência anual entre 1 e 7,5 por 1000 habitantes. Cerca de 1% da população mundial é afetada, uma incidência que praticamente se mantém constante ao longo do tempo (OMS, 2015a, OMS, 2015b). A incidência de esquizofrenia no Brasil é semelhante à de outros países, acomete 4 em cada 10 mil adultos (BEHENCK et al., 2011).

Uma diminuição no número de pacientes que buscam tratamento de esquizofrenia também aparece, no entanto, devido a diferentes práticas de diagnósticos, não se pode comprovar essa redução. Estudos apontam que pacientes com esquizofrenia têm entre 2 e 2,5

vezes mais chance de morrer em idade jovem que a população não acometida pela doença. Isto está relacionado à frequência de suicídio, além das enfermidades cardiovasculares, metabólicas e infecciosas (OMS, 2015a; OMS, 2015b).

O tratamento farmacológico para essa doença consiste na utilização dos antipsicóticos ou neurolépticos, que levam dias a semanas para produzirem seus efeitos terapêuticos máximos. No século XX, houve a Revolução Farmacológica da Psiquiatria, devido à introdução dos medicamentos capazes de tratar desordens mentais denominadas de psicoses. Pacientes, que antes estariam isolados em ambiente hospitalar, ganharam a chance de poder retornar ao convívio social. Apenas nos anos 50, houve a admissão dos medicamentos antipsicóticos. Estes são divididos em duas classes distintas: os antipsicóticos típicos ou de 1^a geração e os antipsicóticos atípicos ou de 2^a geração (SILVA, 2006).

Os neurolépticos típicos ou de 1^a geração apresentam o mecanismo de ação de antagonizar o receptor de dopamina D₂, portanto apresentam eficácia terapêutica contra os sintomas positivos da esquizofrenia e de outros distúrbios mentais. Porém, seu impacto sobre os sintomas negativos apresenta-se bastante modesto. Clorpromazina, haloperidol e imipramina foram introduzidos primeiramente, porém efeitos adversos neurológicos como, distonia aguda e tardia, parkinsonismo e efeitos extrapiramidais (rigidez, tremores e hipocinesia) prevalecem como responsáveis pela enorme dificuldade de adesão ao tratamento (BARCELOS, 2009).

Com relação aos neurolépticos atípicos ou de 2^a geração, seu mecanismo de ação ainda não é definido, porém enfatiza-se que o antagonismo dos receptores dopaminérgicos do tipo D₁, D₃ ou D₄ e também de receptores serotoninérgicos 5-HT₂ caracterizam sua atividade farmacológica. Daí o seu aspecto mais diferenciado, devido à capacidade de apresentarem uma eficácia terapêutica em determinadas doses que não ocasionam, significativamente, os efeitos adversos extrapiramidais. No entanto, são fármacos que possuem um alto custo de produção, o que inviabiliza o seu uso em alguns países em desenvolvimento. São exemplos desta classe: clozapina, olanzapina, quetiapina, aripripazol, sulpirida e risperidona (ARJI, 2010; TORT, 2005).

Segundo a OMS, mais de 50% dos pacientes esquizofrênicos não recebem atenção médica/psiquiátrica e 90% deles vivem em países de renda econômica média e baixa. Isto significa um importante problema mundial, a falta de acesso aos serviços de saúde mental e medicamentos, além de que esses pacientes esquizofrênicos são menos propensos a solicitar ajuda médica.

No Brasil, os medicamentos utilizados no tratamento da esquizofrenia são disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), estando integrados ao Componente Especializado da Assistência Farmacêutica (CEAF), que é uma estratégia realizada pelo SUS para garantir acesso gratuito a medicamentos que possuem alto valor unitário ou quando o tratamento é considerado extremamente caro, devido a sua periodicidade (BRASIL, 2012a). E também estão presentes na Relação Nacional de Medicamentos do Componente Básico da Assistência Farmacêutica (RENAME) (BRASIL, 2013). Segundo nota publicada, em 2009, no *website* do Ministério da Saúde, os gastos federais para compra e disponibilização desses medicamentos são, em média, R\$ 220 milhões ao ano (BRASIL, 2009).

3.2 Olanzapina

A olanzapina (OLZ) é um fármaco antipsicótico, da classe dos tienobenzodiazepínicos, que possui ação no sistema nervoso central, propiciando a melhora dos sintomas psicológicos. Seu principal uso é em pacientes com transtorno de esquizofrenia e ainda outros transtornos mentais (psicoses e episódios maníacos) bem como, em pacientes com transtorno bipolar, nos quais, previne novas fases de mania e depressão (MOURA, 2009). Atualmente, junto a outros três fármacos, quetiapina, aripiprazol e risperidona, são responsáveis pela movimentação de cerca de 19 bilhões de dólares em vendas por ano, no mundo (FRAGA et al., 2010).

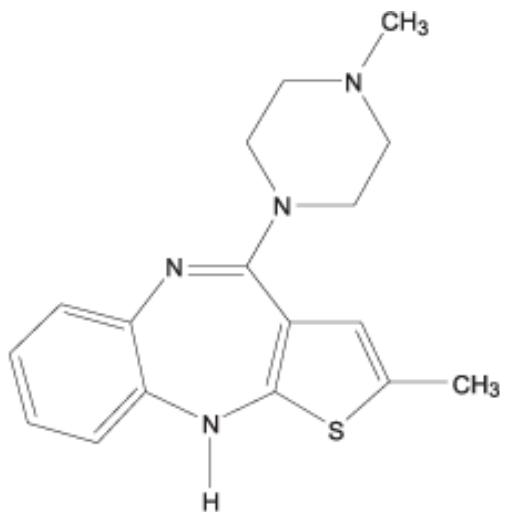
Esse fármaco foi obtido, em 1982, pela empresa inglesa Eli Lilly, a partir da clozapina e na década de 90, começou a ser comercializado na Europa e nos Estados Unidos, por ser mais seguro que a clozapina, com relação à agranulocitose (RÊGO et al., 2010). No Brasil, passou a ser distribuído pelo Ministério da Saúde apenas em 1999, fazendo parte dos medicamentos excepcionais e em 2009 entrou no Componente especializado de Assistência Farmacêutica (BRASIL, 2009). No mesmo ano, foi firmada uma Parceria para Desenvolvimento Produtivo entre o Ministério da Saúde, o laboratório público Laboratório Farmacêutico do estado de Pernambuco (Lafepe) e o laboratório privado (Cristália), para produção de alguns medicamentos, entre eles, a OLZ, visando avanço tecnológico e desenvolvimento de medicamentos no país (BRASIL, 2015).

No mercado, a OLZ é disponibilizada na forma farmacêutica de comprimidos revestidos em concentrações de 2,5, 5 e 10 mg como Zyprexa®. Na forma de comprimidos orodispersíveis em concentrações de 5 e 10 mg como Zyprexa Zidis® e ainda, na forma de pó para injetáveis como o Zyprexa IM® e sua patente foi expirada em 2011 (BRASIL, 2014).

3.2.1 Características químicas

A OLZ (Figura 1) possui fórmula molecular $C_{17}H_{20}N_4S$ e peso molecular de 312,43 $g \cdot mol^{-1}$. Sua nomenclatura química é 2-metil-4-(4-metil-1-piperazinil)-10H-tieno [2,3-b] [1,5] benzodiazepina e apresenta-se como um sólido cristalino amarelo. Pertence à categoria de classe II do sistema de classificação biofarmacêutica (SCB), sendo altamente permeável através das membranas biológicas, mas possui baixa solubilidade em H_2O . Sua solubilidade aquosa é de 0,0343 mg.mL⁻¹ a 37°C (DIXIT; KINI; KULKARNI, 2011).

Figura 1 - Estrutura química da olanzapina.



Fonte: <http://www.alsachim.com/>

3.2.2 Propriedades farmacodinâmicas

Seu mecanismo de ação ainda não é comprovadamente elucidado, mas sabe-se que possui modesta afinidade pelo receptor dopaminérgico do tipo D₂ e apresenta boa afinidade pelos receptores dopaminérgicos D₁ e D₄, serotoninérgicos 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₆, colinérgicos muscarínicos (subtipos 1-5), adrenérgicos (alfa1) e ainda, histaminérgicos (H₁) (SARIN; DEL PORTO, 2009). Pode ser observado o efeito farmacológico da droga na diminuição dos sintomas negativos da esquizofrenia e ainda baixa incidência de efeitos extrapiramidais, sendo, então, classificada como neuroléptico atípico ou de 2^a geração (FDA, 2014; MITCHELL et al., 2013).

3.2.3 Propriedades toxicológicas

Os antipsicóticos atípicos apresentam menor propensão à ocorrência dos efeitos extrapiramidais, mas estão associados a vários outros efeitos adversos, como sedação, boca seca, visão turva, taquicardia, hipotensão postural entre outros (OMS, 2015b). Além desses, há outro efeito indesejado de grande significância, o ganho de peso, que apresenta uma relação com o aumento de doenças cardiovasculares (hipotensão ortostática, arritmias) e também distúrbios metabólicos, como a dislipidemia, diabetes, aumento de taxa de triglicerídeos, baixos níveis de colesterol (HDL), hipertensão arterial e hiperglicemia em jejum (LEUNG et al., 2014; ZUGNO et al., 2012).

O aparecimento de doenças cardiovasculares indica um aumento do risco de morte, sendo considerada a principal causa de mortalidade entre os pacientes esquizofrênicos. E os distúrbios metabólicos podem ser ocasionados pelo aumento da decorrência de forte estresse e estilo de vida durante a doença e principalmente, pelo uso dos atípicos (FONSECA, 2009; VARGAS; SANTOS, 2011). Esses efeitos adversos são fatores frequentes da não adesão ao tratamento antipsicótico (MELLO, 2009).

Ainda não é bem explicado o mecanismo fisiopatológico dos antipsicóticos e a relação com o ganho de peso. Há literaturas que indicam que os sistemas de neurotransmissores noradrenérgicos e histaminérgicos estão envolvidos. O sistema noradrenérgico regula a ingestão de alimentos e o sistema histaminérgico é o mediador do comportamento alimentar (POYUROVSKY et al., 2013). A olanzapina é o antipsicótico com maior potencial para ganho de peso dentre todos os outros atípicos, por exibir afinidade com receptores H₁, seu antagonismo confere estímulo do apetite e consequentemente, aumento de peso (GUESDON; DENIS; RICHARD, 2010; POYUROVSKY et al. 2007; STEINER et al., 2013).

Alguns estudos têm mostrado a ocorrência do ganho de peso e o uso de antipsicóticos atípicos. Vargas e Santos (2011) mostram que a prevalência de ganho de peso, o aumento de circunferência abdominal, hipertensão arterial e síndrome metabólica em pacientes esquizofrênicos tratados com antipsicóticos atípicos foi maior do que a população geral. Fonseca (2009) mostra que pacientes esquizofrênicos apresentam um aumento de peso de 12% no intervalo de dois meses de tratamento com OLZ. Mello (2009) aponta que houve uma aumento de peso médio de 8kg em 10 pacientes em tratamento com OLZ durante 60 dias de estudo.

Poyurovsky e colaboradores (2013) mostram que a administração de OLZ juntamente com um inibidor seletivo de reabsorção de norepinefrina (reboxetina) e um agonista H1 (beta-

histina) promovem um aumento de peso bem menos significativo quando comparado com OLZ e placebo. E através desse último estudo pode-se observar a relação entre o uso dos atípicos e suas afinidades pelos receptores histamínérgicos e noradrenérgicos ocasionando o ganho de peso.

3.2.4 Propriedades farmacocinéticas

A OLZ apresenta boa absorção após administração oral em estado de jejum ou após alimentação. Contudo, 40% sofrem biotransformação antes de atingir a circulação sanguínea. Sua metabolização ocorre no fígado pelas CYP1A2 e CYP2D6 do citocromo P450, originando o metabólito de maior quantidade 10-N-glucuronida e outros dois, *N*-desmetil e 2-hidroximetil ambos com atividade farmacológica insignificante. Sua excreção é realizada pela urina, cerca de 57% na forma de metabólitos e também no leite materno. Seus dados farmacocinéticos podem variar em função do tabagismo, da idade e do sexo (MOURA, 2009).

Com relação à farmacocinética plasmática em animais, Pervaiz e colaboradores (2015) fizeram um estudo farmacocinético em ratos ($n=6$) com dose oral de $7\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ e os valores dos parâmetros farmacocinéticos foram: concentração máxima no plasma ($C_{\text{máx}}$): $412,7 \pm 18,7 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, área sob a curva ASC_{0-t} : $1956,7 \pm 119,2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, $ASC_{0-\infty}$: $1959,5 \pm 119,5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e o tempo necessário para atingir a concentração máxima, $T_{\text{máx}}$ foi de 1 h.

Um estudo de farmacocinética em humanos (bioequivalência), aleatório do tipo cruzado e duplo cego, com 21 participantes de pesquisa sadios, dose administrada por via oral de 10 mg de OLZ da formulação teste e da formulação referência, mostram que os parâmetros farmacocinéticos são semelhantes. Os resultados da formulação teste e referência foram: $C_{\text{máx}}$: $11,41 \pm 2,75$ e $11,30 \pm 2,64 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, ASC_{0-t} : $142,9 \pm 35,4$ e $142,6 \pm 39 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, $ASC_{0-\infty}$: $232,6 \pm 68,5$ e $254,75 \pm 104,1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e $T_{\text{máx}}$ foi 3,2 e 3,4 h, respectivamente. E os medicamentos foram considerados bioequivalentes (SAAVEDRA et al., 2009).

Outro estudo foi realizado comparando duas formulações de OLZ de 2,5 mg, via oral, em 26 participantes de pesquisa sadios. O desenho foi aberto, randomizado, cruzado 2X2 com período de *washout* de 21 dias. Os parâmetros farmacocinéticos médios calculados para as formulações teste e referência foram: ASC_{0-72} $116657,480 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e $120619,617 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, para $C_{\text{máx}}$ foram $4442,975 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $4678,317 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e para $T_{\text{máx}}$ foram 4,0 h e 4,7 h, respectivamente. As formulações foram consideradas intercambiáveis, pois foram bioequivalentes (CARDOSO et al., 2012).

3.3 Microdiálise

A microdiálise (MD) cerebral é uma técnica descoberta na década de 60, que vem sendo utilizada na área de farmacologia, fisiologia e patologia. Seu primeiro estudo foi para mensurar concentrações de neurotransmissores em cérebro de primatas não humanos (DELGADO, 1972) e em ratos (UNGERSTEDT; PYCOCK, 1974). Hoje, é largamente utilizada no campo da neurociência para o monitoramento da concentração de neurotransmissores (NTs), como dopamina, serotonina e noradrenalina (DARVESH et al., 2011). Além de quantificar também aminoácidos, peptídeos, ácido ascórbico, glicose, lactato, fármacos e seus metabólitos em regiões específicas do cérebro dos animais (GARCÉS-RAMÍREZ et al., 2013; LI et al., 2006; OLIVEIRA, 2010b).

A técnica possui a vantagem de rápida implantação na rotina de um laboratório ou indústria farmacêutica, com custo relativamente baixo de consumíveis e possibilidade de confecção de sondas dentro do próprio laboratório (LIETSCHÉ et al., 2014). As amostras coletadas no local de implante da sonda, que pode ser uma área específica do cérebro, permitem acompanhar a mudança de concentração dos NTs em função do tempo e a técnica possibilita também que substâncias exógenas sejam administradas por via intracerebral (DARVESH et al., 2011; LI et al., 2006).

As amostras da MD cerebral são limpas, não necessitando de metodologia de extração, podendo ser analisadas de imediato ou congeladas até sua análise. E com o desenvolvimento da química analítica, técnicas bastante sensíveis, tais como cromatografia líquida, espectrometria de massa e detecção electroquímica são fundamentais para facilitar a utilização da MD cerebral (DARVESH et al., 2011). A coleta pode ser de forma contínua, por período de horas ou dias em um mesmo animal. Como não há perdas de fluidos corporais, pode ser utilizado um animal de pequeno porte. E ainda, há a possibilidade de implantação de diferentes sondas em diferentes regiões em um mesmo animal (DARVESH et al., 2011; LIRA, 2006; MUNARI, 2006).

Devido a região cerebral de implantação da sonda manter suas características fisiológicas durante o experimento, um reduzido número de animais pode ser utilizado. O animal ainda pode permanecer acordado e com livre movimento durante todo o tempo de experimento, dispensando utilização de anestesia. Isto é uma ferramenta importante para avaliar a relação entre concentração de NTs, mecanismo de ação de determinado fármaco e comportamento natural ou alterado de um animal (FREDDO, 2009; LI et al., 2006; NANDI; LUNTE, 2009).

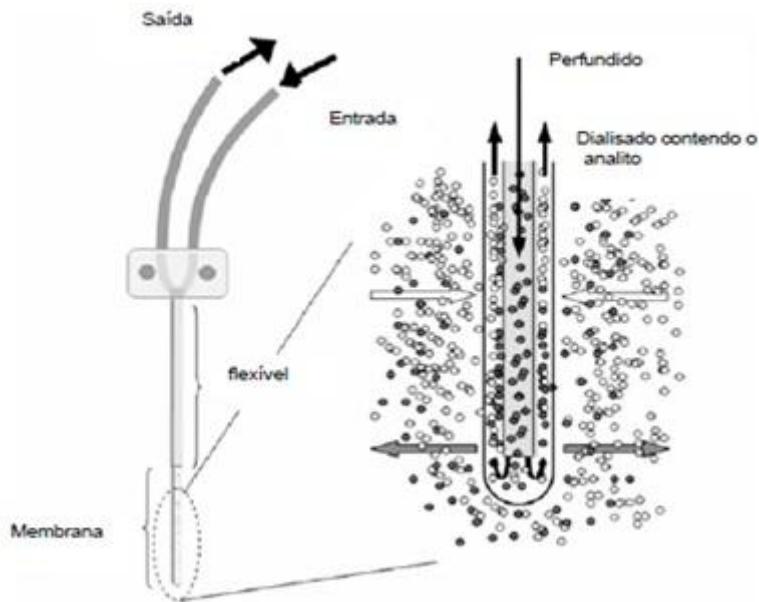
A MD cerebral apresenta algumas limitações. Quando a sonda de MD é inserida pode ocasionar danos ao tecido cerebral e uma resposta inflamatória é vista, causando obstrução da membrana semipermeável devido a entupimento da sonda decorrente da ocorrência de gliose. Também pode haver contaminação microbiana, necessitando que seja realizada desinfecção na sonda e danos à barreira hematoencefálica que pode se reestabelecer rapidamente ou causar alteração da permeabilidade da sua membrana (MUNARI, 2006; NANDI; LUNTE, 2009).

A sonda inserida no cérebro exibe uma porcentagem de recuperação do analito em estudo, através da difusão pela membrana semipermeável, que não alcança 100%. E para definir a real concentração deste analito, torna-se necessário determinar a capacidade de recuperação desta sonda através de um método de calibração (DHANANI et al., 2010). A recuperação está relacionada com fluxo de perfusão e o tempo de coleta das amostras. Alta recuperação, necessita de baixo fluxo de perfusão e maior tempo de coleta, no entanto, fornece um volume de amostra reduzido, necessitando que o método de quantificação seja sensível o suficiente para detecção do analito (NANDI; LUNTE, 2009). Nos experimentos de MD cerebral a taxa de fluxo varia entre 0,5 a 5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e o tempo de coleta de 5 a 30 min (MUNARI, 2006).

Atualmente, tem sido empregada no estudo de doenças psiquiátricas (déficit de atenção e esquizofrenia) e doenças neurodegenerativas (Alzheimer e Parkinson), proporcionando maior conhecimento a respeito da etiologia e dos seus tratamentos terapêuticos (DARVESH et al., 2011). Seu uso foi estendido a diversos outros tecidos do corpo como pele, tecido subcutâneo, coração, pulmão, sangue, olho, fígado, tumores sólidos, utilizando não apenas animais, como também seres humanos (AGGARWAL et al., 2007; ARAÚJO et al., 2013; KAUL et al., 2010; LEVEQUE et al., 2004; LI et al., 2006; VIEIRA et al., 2010).

O princípio da técnica compreende a difusão de substâncias hidrossolúveis, através de uma membrana de diálise (Figura 2). A técnica é realizada através da inserção de uma pequena sonda de diálise no tecido (órgão) alvo. Na porção terminal desta sonda encontra-se uma membrana semipermeável e inicia-se um fluxo constante com um líquido de perfusão específico, que produz um gradiente de concentração ao longo da membrana, possibilitando difusão passiva de substâncias de baixo peso molecular, variando entre 20.000 a 60.000Da, do fluido intersticial para o líquido de perfusão (BASTOS et al., 2013; TSAI, 2011).

Figura 2 - Esquema de uma sonda de microdiálise.



Fonte: Adaptado de TASSO, 2008.

As sondas de MD são normalmente constituídas por uma tubulação de entrada, por onde passa o perfusato e de saída, por onde passa o dialisado e uma membrana semipermeável na extremidade que insere no tecido. As tubulações são capilares que podem ser se sílica fundida, teflon, ou poliéster cetona. As sondas inseridas no cérebro são do tipo concêntricas, pois possuem um design mais apropriado para inserção vertical (PLOCK; KLOFT, 2005). A membrana é constituída de acetato de celulose ou polieter carbonato, com um tamanho de poro (*cutoff*) que varia entre 6 e 100 kD e seu tamanho varia de 1 a 4 mm para animais e 10 mm para seres humanos (MUNARI, 2006).

O dialisado, líquido coletado na extremidade de saída da sonda, contém a substância que se difundiu através da membrana semipermeável e quando analisado, não reflete exatamente a concentração da substância livre no tecido, mas sim, uma fração desta concentração. O equilíbrio dinâmico entre os dois meios (meio tecidual com substância e líquido de perfusão, que está isento dessa substância) não é atingido completamente devido a alguns fatores, tais como, local de inserção da sonda, porosidade da membrana, o fluxo de perfusão, o fluxo sanguíneo local, características físico químicas da substância, o próprio tecido e ainda a temperatura do animal (ARAÚJO, 2008a; LIRA et al., 2006; NANDI; LUNTE, 2009).

Essa concentração livre da substância no tecido pode ser calculada através da razão entre a concentração no dialisado e a concentração presente no tecido, sendo denominada

recuperação relativa (RR) ou eficiência da membrana. Técnicas de recuperação *in vitro* e *in vivo* devem ser utilizadas para determinar essa quantidade de substância que pode ser recuperada, para que essa concentração determinada tenha validade, no entanto, isto é considerado um fator crítico inerente à técnica da MD. A recuperação *in vitro* é do tipo recuperação por ganho (diálise) e por perda (retrodiálise), sendo esta última também um tipo de recuperação *in vivo* e o fluxo líquido zero ou *no net flux*. E para definir o tipo de recuperação utilizada vai depender do tipo de MD (ARAÚJO et al., 2008b; MÜLLER, 2012).

A recuperação *in vitro* é determinada por diálise, onde a sonda é inserida em uma solução contendo o fármaco (meio externo) cuja concentração é conhecida, sob agitação e temperatura controlada e um líquido de perfusão calibrador é perfundido através da sonda, realizando a difusão do analito. A taxa de recuperação por ganho é calculada pela equação 1.

$$RRgan\% = \left(\frac{C_{dial}}{C_{ext}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde: RRgan é a taxa de recuperação relativa por ganho, C_{dial} é a concentração da substância no dialisado e C_{ext} é a concentração conhecida do meio externo, que é a solução (VIERA et al., 2010).

A retrodiálise é conhecida como uma técnica de liberação que pode ser realizada *in vitro* e *in vivo* e funciona de forma que, a sonda é inserida num recipiente com uma solução isenta de substância e perfundida com uma solução contendo a substância de concentração conhecida. A difusão da substância ocorrerá para fora da membrana, sendo a taxa de recuperação por perda calculada através da equação 2.

$$RRper\% = \left(\frac{C_{perf} - C_{dial}}{C_{perf}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde: RRper é a taxa de recuperação relativa por perda, C_{perf} é a concentração conhecida da substância no líquido de perfusão e C_{dial} é a concentração da substância no dialisado após passagem pelo meio (PLOCK; LOFT, 2005; TORRÃO, 2007).

Durante a retrodiálise, determinadas características físico químicas do fármaco influenciam significativamente o processo de difusão através da membrana. Fármacos hidrofílicos apresentam porcentagem de recuperação igual na recuperação por perda e ganho, enquanto fármacos lipofílicos não apresentam valores semelhantes, devido a capacidade de adsorção/ligação ao tubo FEP (tetrafluoroetileno e hexafluoropropileno), de entrada e saída da sonda e ao próprio material da sonda. Esse processo ocasiona interpretação errônea da real concentração do fármaco. Algumas alternativas têm surgido para reduzir essa adsorção, como

o uso de albumina bovina adicionada ao líquido de perfusão e tubos de polieteretercetona, conhecido como tubos PEEK (HOU et al., 2014; NIROGI et al., 2012).

O Fluxo líquido zero ou (*no net flux*) é um método de recuperação *in vivo* que foi desenvolvido por Lönnroth e colaboradores (1987) e consiste na perfusão da substância de interesse em diferentes concentrações, mantendo-se a concentração do fluido extracelular constante. A substância deve estar na concentração de *steady state* no animal, através da perfusão contínua. E a sonda deve ser perfundida com solução de diferentes concentrações da substância de interesse. No momento que a concentração da substância estiver menor no líquido de perfusão (C_{perf}) do que no tecido, ocorre a difusão para o líquido de perfusão, aumentando sua concentração no dialisado (C_{dial}) (MÜLLER, 2012).

Quando não há mais difusão da substância, torna-se o ponto de fluxo zero, onde as concentrações estão semelhantes no líquido de perfusão e no tecido. E a regressão linear entre a diferença da concentração da substância no dialisado e no líquido de perfusão ($C_{dial} - C_{perf}$) em função da concentração no líquido de perfusão (C_{perf}) fornece a reta que passa no ponto de fluxo zero. A equação 3 descreve esta relação.

$$RR = \left(\frac{C_{dial} - C_{perf}}{C_{perf}} \right) \quad (3)$$

Onde RR é a taxa de recuperação relativa, C_{dial} é a concentração no dialisado, C_{perf} é a concentração no líquido de perfusão (ARAÚJO, 2008a).

Essa técnica também pode ser realizada utilizando um padrão interno, ou calibrador, que deve ser uma substância que possua coeficiente de difusão semelhante à substância em estudo, este deve ser adicionado ao líquido de perfusão. E o resultado da recuperação por perda do calibrador, refletirá a recuperação da substância em estudo. Isso pode facilitar o entendimento de variações de valor durante o experimento, por exemplo, quando a sonda estiver com vida útil reduzida, pois havendo uma mudança no valor da recuperação relativa da substância em estudo deverá ser observada, também, mudança no valor da recuperação relativa do calibrador (MUNARI, 2006).

Os dialisados, que são as amostras coletadas após a passagem do líquido de perfusão, são analisados por diversas técnicas de quantificação altamente sensíveis: espectrometria de massas, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), eletroforese capilar e imunoensaios. Uma vez que os dialisados são amostras limpas, isentas de proteínas, não necessitando de purificação ou metodologia de extração, podendo ser analisados diretamente, o que já foi mostrado ser uma vantagem da técnica de MD (ARAÚJO, 2008a).

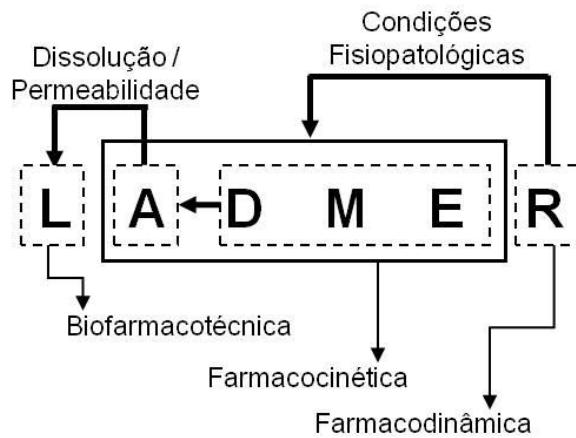
Atualmente, a técnica de MD, não é apenas cerebral como também aplicada a outros tecidos, esta permite realização automática desde a coleta até a injeção de amostras nos equipamentos para análise, com exceção para a cirurgia de inserção da sonda na região específica do órgão em estudo. E está sendo bastante utilizada nas indústrias farmacêuticas para facilitar a descoberta de novos fármacos e aprimorar conhecimento sobre doenças e fármacos já consolidados (ZHANG; BEYER, 2006).

3.4 Farmacocinética

A resposta terapêutica de um fármaco está relacionada com diferentes etapas no organismo até obtenção da resposta farmacológica e depende da concentração deste em seu local de ação, quando se encontra ligado ao seu receptor, no interior das células. Quando um fármaco é administrado inicia-se a fase biofarmacêutica (liberação do princípio ativo da forma farmacêutica e dissolução nas membranas biológicas). Em seguida, a fase farmacocinética e é distribuído pelo sangue, o fluido corporal que faz a ligação com todos os órgãos do corpo, possibilitando a interação fármaco-receptor e consequentemente, a resposta terapêutica, sendo esta a fase farmacodinâmica (RANG; DALE, 2012).

A relação entre a fase farmacocinética e farmacodinâmica (Figura 3) é a concentração-resposta de um fármaco no organismo. A fase farmacocinética diz respeito à entrada do fármaco no organismo com influência da dose, forma farmacêutica, via de administração e avalia matematicamente a sua concentração e de metabólitos atingida em função do tempo, através de cálculos dos parâmetros farmacocinéticos. E a fase farmacodinâmica se refere à concentração do fármaco e seus efeitos terapêuticos e indesejados em função do tempo (TOZER; ROWLAND, 2009).

Figura 3 - Relação entre farmacocinética e farmacodinâmica.



Fonte: Adaptado de BEDOR, 2014. * A seta grossa em negrito significa que os processos são dependentes. L- liberação, A- absorção, D – distribuição, M- metabolismo, E- excreção, R- resposta.

A farmacocinética é o ramo da farmacologia que estuda os processos que determinado fármaco sofre no organismo e a relação das concentrações deste e/ou de seus metabólitos com o tempo (LABOUNE, 1993). Os processos farmacocinéticos a que um fármaco está sujeito são absorção, distribuição, metabolismo ou biotransformação e excreção (ADME) e descrevem o caminho que estes percorrem no organismo, ocorrendo simultaneamente e não de forma sequencial (SILVA, 2013).

O processo de absorção ocorre para inúmeras vias de administração, exceto para as vias intravenosa e intrarterial. Consiste na transferência do fármaco inalterado da via de administração até ser disponibilizado na circulação sanguínea. E a passagem do fármaco pelo epitélio intestinal é a absorção propriamente dita. Após administrado, o fármaco percorre um caminho até a sua absorção e durante este caminho, aparecem locais onde pode ocorrer a perda de fármaco, nos tecidos gastrintestinais e no fígado, por exemplo, e esse fenômeno é denominado de efeito de primeira passagem (TOZER; ROWLAND, 2009).

A absorção de um fármaco ocorre através das membranas do trato gastrointestinal (TGI) nas células da mucosa do estômago, intestinos e do cólon e, principalmente, nos segmentos intestinais duodeno, jejuno e íleo, que são os principais locais de absorção de fármacos, devido a enorme área de superfície e presença de inúmeros sítios de absorção. É um processo dependente do tamanho de molécula, lipofilia e grau de ionização. Um fármaco atravessa facilmente as membranas do TGI quando está na sua forma não ionizada, que também apresenta maior lipofilicidade e sua velocidade de passagem é determinada pelo fluxo sanguíneo (STORPIRTS et al., 2011).

Os mecanismos de absorção são transporte passivo transcelular, facilitado e transporte ativo. O transporte passivo transcelular ocorre da região de maior concentração no sentido do gradiente de concentração, sem gasto de energia, dependendo apenas do grau de hidro/liposolubilidade e da quantidade de droga não ionizada. O transporte ativo é mediado por carreadores de membrana ocorre com gasto de energia, quando a molécula liga-se de forma reversível e estes para atravessar as membranas celulares no sentido contrário do gradiente de concentração. E o transporte por difusão facilitada se faz através de carreadores, no entanto, no sentido do gradiente de concentração, sem necessitar de gasto de energia (LABOUNE, 1993; STORPIRTS et al., 2011).

Alguns fatores podem interferir na absorção como forma farmacêutica, características físico químicas do fármaco (tamanho da partícula, caráter cristalino ou amorfo), grau de solubilidade (certa hidrossolubilidade para se difundir nos líquidos do organismo e certa lipofilia para atravessar as membranas biológicas), tempo de esvaziamento gástrico, trânsito intestinal, presença de alimentos etc (RANG; DALE, 2012).

A absorção não se restringe apenas à via oral, aplica-se também às vias intramuscular, subcutânea e as outras vias extravasculares. No caso da via intravenosa, não há absorção, a dose é aproveitada por completo, diz-se, portanto, que a biodisponibilidade ou velocidade e extensão da entrada do fármaco na circulação sistêmica é 100% (STORPIRTS et al., 2011; TOZER; ROWLAND, 2009).

Após absorção, o fármaco é distribuído através da corrente circulatória aos tecidos (local de ação), como também é eliminado, esse processo denomina-se disposição. Essa distribuição até os tecidos do organismo depende da irrigação sanguínea, pH e características de membrana do tecido, grau de ligação às proteínas plasmáticas, pKa e coeficiente de partição do fármaco. Estando o fármaco na sua forma livre, ou seja, não ligado a proteínas, o mesmo alcança o local alvo que possui afinidade para exercer sua atividade terapêutica, bem como provocar os efeitos adversos (LABOUNE, 1993).

O metabolismo ou biotransformação é a conversão do fármaco através de ação de enzimas intestinais, hepáticas e pulmonares em outra entidade química, o metabólito, que por ser mais hidrossolúvel, é mais facilmente eliminado. Considera-se como uma estratégia do organismo em adicionar grupos polares à molécula do fármaco a fim de torná-lo mais solúvel para ser eliminado na urina. O metabolismo nem sempre significa inativação do fármaco, algumas vezes após as reações de biotransformação, o fármaco é ativado farmacologicamente, é quando se administra um pró-fármaco. Ou o metabólito é potencialmente mais tóxico do que o fármaco (STORPIRTS et al., 2011).

O metabolismo pode ser afetado pelas características do fármaco, via de administração e também pela variabilidade entre os indivíduos. As enzimas responsáveis pela metabolização são principalmente as isoenzimas do citocromo P450, que devido à variabilidade interindividual, podem ser observadas diferenças nas concentrações plasmáticas e na eliminação de um fármaco entre cada indivíduo. A ausência de certos sistemas enzimáticos, que é decorrente do polimorfismo genético, implica que a metabolização de um fármaco varia em função da reação enzimática e da origem étnica dos indivíduos (LEBLANC, et al., 2000; STORPIRTS et al., 2011; TOZER; ROWLAND, 2009;).

O processo de eliminação pode ser realizado diretamente e de forma irreversível com o fármaco inalterado, ou transformado em metabólitos a nível renal ou biliar, como também pelo leite, suor, saliva e pelo ar exalado pelos pulmões (LABOUNE, 1993). O rim é o principal órgão responsável pela excreção de fármacos e a via renal compreende três processos fisiológicos: a filtração glomerular, a secreção tubular ativa e a reabsorção tubular passiva (LABOUNE, 1993; STORPIRTS et al., 2011).

3.4.1 Modelos compartimentais

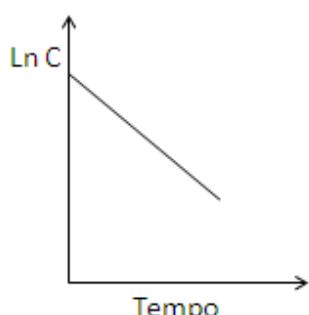
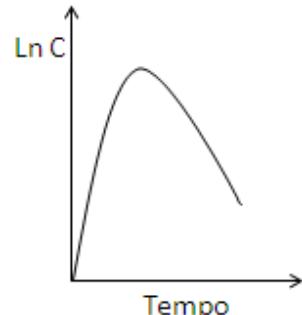
Na farmacocinética, os modelos matemáticos são propostos para descrever o comportamento cinético do fármaco no organismo, utilizando equações que permitem descrever a evolução temporal das concentrações plasmáticas do fármaco e permite determinar as constantes de velocidade das transformações ocorridas com o fármaco no organismo [constantes da velocidade de absorção (K_a), distribuição (K_{12} , K_{21}) e eliminação (K_e)], além de calcular os parâmetros farmacocinéticos. Estes modelos são classificados como compartimentais ou não compartimentais e o organismo é estudado como compartimentos, podendo ser mono (apenas um compartimento) ou multicompartimental (dois ou mais compartimentos) (LEBLANC et al., 2000).

Os modelos não compartimentais têm mais aproximação com a realidade do organismo interpretando o que ocorre com o fármaco no organismo. Estes modelos são baseados na teoria dos momentos estatísticos, que considera a permanência do fármaco no organismo, ou tempo de residência médio (MRT, em inglês *mean residence time*), que é expresso pela área sob a das concentrações plasmáticas versus tempo relacionada com área sob o momento da curva (ASMC). O MRT é o tempo necessário para que 63,2% da dose administrada sejam eliminados. Também é abordado nestes modelos o tempo de absorção médio (MAT, em inglês *mean absorption time*), que significa o tempo médio necessário para

a ocorrência da absorção de um fármaco administrado por via oral ou por outras vias extravasculares. Nestes modelos, a eliminação é estimada pelo Clearance. A distribuição é calculada através do cálculo do volume de distribuição no estado de equilíbrio (DAVANÇO, 2015; STORPIRTIS et al., 2011).

O modelo monocompartimental é o modelo mais simples possível. Considerando que a via de administração seja intravascular, o modelo apresenta apenas uma única constante K_e . Considerando a via de administração extravascular, presume-se que o fármaco seja absorvido e distribuído instantânea e homogeneamente pelo sangue e tecidos do organismo, portanto, é introduzida também K_a (LEBLANC et al., 2000). No perfil farmacocinético de determinado fármaco, que corresponde aos valores de concentração plasmática versus tempo, se transformados em logaritmo natural (Ln) e o gráfico apresentar uma única inclinação, a disposição cinética é monocompartimental (DAVANÇO, 2015; STORPIRTS et al., 2011). A figura 4 representa o modelo monocompartimental após administração intra e extravascular.

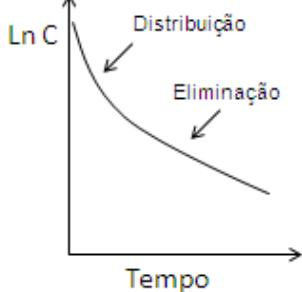
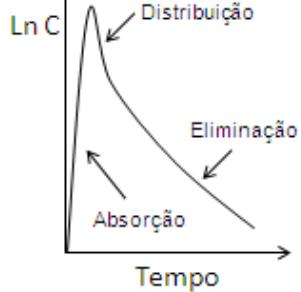
Figura 4 - Representação do modelo monocompartimental após administração intra e extravascular.

	Administração intravascular	Administração extravascular
Representações compartimentais	$Q \rightarrow \boxed{Q} \xrightarrow{K_e} Q$	$Q \xrightarrow{K_a} \boxed{Q} \xrightarrow{K_e} Q$
Representações gráficas		
Representações matemáticas	$C = C_0 e^{-kt}$	$C = A (e^{-ket} - e^{-kat})$

Fonte: Adaptado de LEBLANC, 2000. Onde: Q – quantidade de fármaco, C- concentração.

O modelo multicompartimental é quando os valores do perfil farmacocinético são transformados em \ln e o processo de eliminação é representado por mais de uma reta e é considerado o modelo mais adequado para interpretação da distribuição do fármaco no organismo. O modelo mais empregado é o bicompartimental e caracteriza-se por duas fases: a fase de distribuição e a fase de eliminação. As constantes K_{12} caracteriza a distribuição do compartimento central (1) para o periférico (2) e K_{21} , o inverso e de eliminação K_{10} , que caracteriza a eliminação do compartimento central. Já o modelo tricompartimental torna-se muito complexo com relação a cálculos matemáticos (LEBLANC et al., 2000; STORPIRTS et al., 2011). A figura 5 representa o modelo bicompartimental após administração intra e extravascular.

Figura 5 - Representação do modelo bicompartimental após administração intra e extravascular.

	Administração intravascular	Administração extravascular
Representações compartimentais	$Q \rightarrow Q_1 \xrightleftharpoons[K_{21}]{K_{12}} Q_2$ $Q \downarrow K_{10}$	$Q \xrightarrow{K_a} Q_1 \xrightleftharpoons[K_{21}]{K_{12}} Q_2$ $Q \downarrow K_{10}$
Representações gráficas		
Representações matemáticas	$C = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$	$C = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\alpha t} + Ce^{-\beta t}$

Fonte: Adaptado de LEBLANC, 2000. Onde: α – constante de distribuição e β - constante de eliminação.

3.4.2 Ordem cinética

A ordem cinética é o modelo que diz respeito à concentração do fármaco no organismo e se relaciona com a velocidade de transferência dele através dos processos fisiológicos de ADME.

A cinética de primeira ordem ou cinética linear acontece quando os sistemas biológicos responsáveis pelo processo fisiológicos não são saturáveis e as concentrações plasmáticas máximas e a ASC são diretamente proporcionais à dose administrada. A cinética de ordem zero ou não linear é entendida como cinética dose dependente. Ocorre quando o sistema enzimático está saturado e condições fisiológicas como gravidez, hipotermia, acidose metabólica, entre outras, também podem ser responsáveis por cinética não linear para determinados fármacos (LEBLANC et al., 2000; STORPIRTS et al., 2011).

3.4.3 Farmacocinética no desenvolvimento de medicamentos

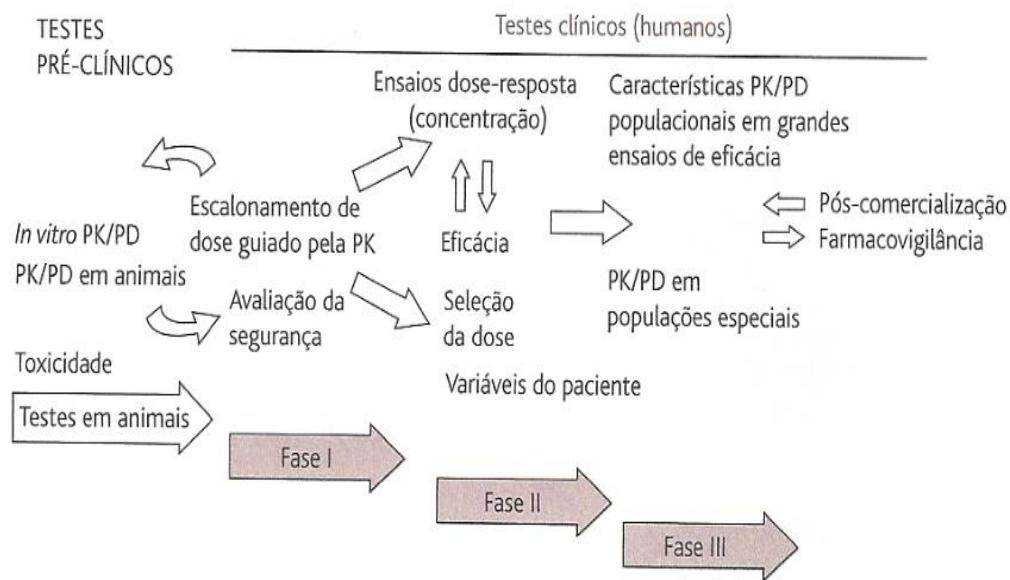
O conhecimento da farmacocinética está interligado ao cotidiano da medicina e da farmácia, proporcionando maior entendimento sobre a influência das concentrações plasmáticas atingidas após uma determinada dose de fármaco e a duração da sua ação farmacológica. É fundamental na adaptação de doses e regimes posológicos, no desenvolvimento de novos fármacos como também no estudo de biodisponibilidade, bioequivalência, bioisenção e equivalência terapêutica de medicamentos genéricos e similares. Além da capacidade de predizer a farmacocinética humana utilizando modelos animais (STORPIRTIS et al., 2011).

A relação farmacocinética-farmacodinâmica (concentração-resposta) vem sendo utilizada pelas indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de novos fármacos. Os processos farmacocinéticos e a resposta terapêutica podem ser semelhantes entre diferentes espécies de mamíferos, desta forma, pode-se prever quantitativamente o possível efeito em humanos. É esta relação quando inserida nos estudos de fase I, realizados com participantes de pesquisa saudáveis, auxiliam a definição da forma farmacêutica e posologia, além de efeitos adversos, seguido de verificação de seu efeito para tal indicação em estudo de fase II com pequeno grupo de participantes de pesquisa pacientes.

As fases I e II definem posologias seguras e efetivas que serão confirmadas nas fases III e IV, realizadas com milhares de pacientes. Uma vez comprovado seu efeito terapêutico e segurança pelas autoridades regulatórias, os medicamentos são disponibilizados no mercado e

permanecem sob vigilância constante (TOZER; ROWLAND, 2009). A figura 6 ilustra o processo de desenvolvimento de novos medicamentos e a relação farmacocinética-farmacodinâmica.

Figura 6 - Processo de desenvolvimento de novos medicamentos e a relação farmacocinética-farmacodinâmica.



Fonte: Adaptado de TOWZER; ROLAND, 2009.

3.4.4 Bioequivalência

O custo de desenvolvimento de um medicamento inovador para a indústria farmacêutica é alto, devido ao investimento necessário para realizar estudos pré-clínicos e estudos clínicos fase I, II e III para garantir eficácia e segurança da formulação. Enquanto que para uma formulação genérica os custos são bem menores, visto que necessita apenas evidenciar a equivalência terapêutica com estudos *in vitro* (equivalência farmacêutica) e *in vivo* (bioequivalência), após a finalização de período de patente do medicamento inovador. No caso dos genéricos, após comprovação dos testes de bioequivalência/biodisponibilidade relativa, ocorre sua disponibilização no mercado e o mesmo é intercambiável com o medicamento inovador (MOREIRA, 2014).

O estudo de bioequivalência/biodisponibilidade relativa consiste em avaliar a extensão e a velocidade que um fármaco é absorvido a partir de uma formulação teste, que é candidato a medicamento genérico ou similar, em relação a uma formulação de referência, já disposta

no mercado. Esse estudo é realizado quando as formulações apresentam fármaco, dosagem e vias de administração semelhantes (STORPIRTIS et al., 2011).

Os estudos de bioequivalência/biodisponibilidade relativa são compostos pelas seguintes etapas: clínica, analítica e estatística (BRASIL, 2006).

A etapa clínica seleciona os participantes de pesquisa, realiza o confinamento, administração do medicamento teste e realiza o cronograma de coletas.

O número de participantes de pesquisa deve ser baseado em estudos realizados anteriormente ou estudo piloto quando não há dado disponível na literatura e deve assegurar um poder estatístico ($> 0,8$), garantindo a confiabilidade dos resultados. Segundo normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o número mínimo deve ser de 12 e, em casos de ausência de dados na literatura, deve ser 24 participantes de pesquisa sadios e confinados sob condições padronizadas de alimentação e acomodações (BRASIL, 2003a, BRASIL, 2003b).

Seguindo um cronograma pré-estabelecido, que deve contemplar um período entre 3 a 5 meia vida de eliminação do fármaco ($t_{1/2}$) em estudo, as amostras biológicas são coletadas a fim de garantir a adequada caracterização do perfil plasmático do fármaco (concentração versus tempo) e tempo de coleta durante o período de eliminação. E se o fármaco apresentar $t_{1/2}$ acima de 24 h, o cronograma de coleta deve ser de, no mínimo, 72 h (BRASIL, 2003a, BRASIL, 2006).

O estudo de bioequivalência/biodisponibilidade relativa é delineado em paralelo, onde cada indivíduo recebe ao acaso apenas uma das formulações, ou o delineamento é cruzado, onde cada indivíduo recebe mais de uma formulação em períodos diferentes, sendo necessário um intervalo de tempo entre as administrações, conhecido pelo termo *washout*, o que deve compreender o período de 7 $t_{1/2}$ do fármaco em estudo, a fim de evitar efeito residual do fármaco no segundo período do estudo. No delineamento cruzado há a vantagem do indivíduo ser o seu próprio controle e a variabilidade interindividual é descartada (BRASIL, 2003a, BRASIL, 2006).

A etapa analítica desenvolve e valida a metodologia de quantificação do fármaco para analisar as amostras biológicas coletadas durante o confinamento dos participantes de pesquisa (BRASIL, 2012b). Essas amostras podem ser quantificadas através de técnicas de radioimunoensaio, elisa, cromatografia líquida com detecção de ultravioleta, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e a técnica que atualmente é a mais utilizada, por ser mais sensível e seletiva é cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM) (MOREIRA, 2014).

A etapa estatística determina o número de participantes de pesquisa e analisa os resultados da etapa analítica através dos cálculos dos parâmetros farmacocinéticos e cálculos estatísticos para avaliar a bioequivalência. As medidas farmacocinéticas avaliadas para a determinação da bioequivalência/biodisponibilidade derivam diretamente da curva de concentração do medicamento ao longo do tempo, através da quantificação de um determinado número de amostras biológicas que foram coletadas durante o estudo. Os parâmetros farmacocinéticos avaliados são: C_{\max} , T_{\max} , área sob a curva da concentração da substância no plasmado instante inicial até o último tempo quantificável (ASC_{0-t}), área sob a curva da concentração da substância no plasma do instante inicial até o tempo relativo à eliminação completa do fármaco ($ASC_{0-\infty}$) e $t_{1/2}$ (BRASIL, 2003b).

Para estabelecer a bioequivalência entre as formulações é realizada uma análise estatística através da avaliação dos parâmetros farmacocinéticos de ASC (extensão de absorção) e C_{\max} (velocidade de absorção). São consideradas bioequivalentes quando o intervalo de confiança de 90%, para a razão entre as médias dos dados transformados logaritmicamente de ASC_{0-t} e de C_{\max} , estiver entre 80 a 125% segundo *Food and Drug Administration* (FDA) e ANVISA (BRASIL, 2006; FDA, 2001).

Produção e avaliação da recuperação de sondas de
microdiálise

4 PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DE SONDAS DE MICRODIÁLISE

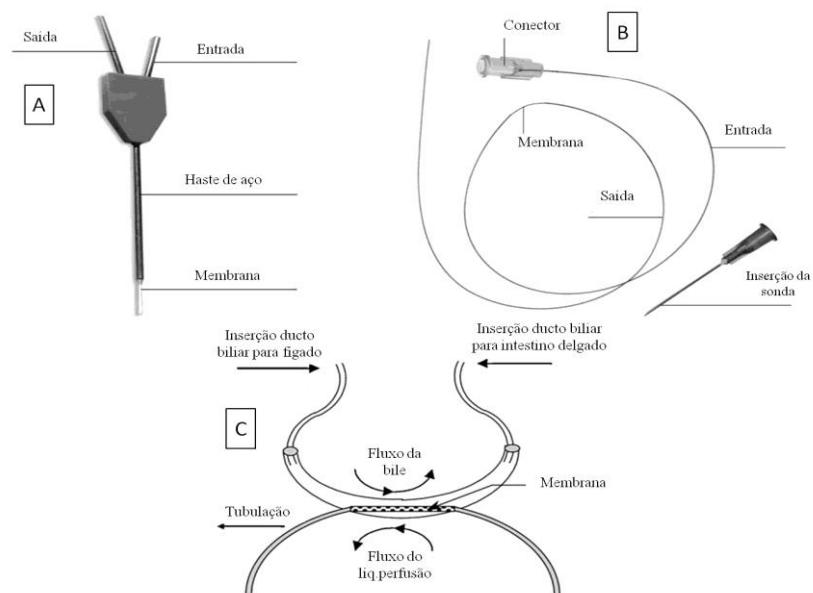
4.1 INTRODUÇÃO

As sondas de MD são inseridas em diversas áreas e órgãos do corpo, tais como cérebro, pele, tecido subcutâneo, olhos, sangue, tanto em animais como em humanos. Apresentam uma membrana semipermeável que, através do fenômeno da difusão passiva, permite a passagem de pequenas moléculas, devido a um gradiente de concentração estabelecido (por perda ou ganho), retirando ou introduzindo estes compostos em um sítio específico sem a ocorrência de perda de fluido fisiológico (NANDI; LUNTE, 2009).

São constituídas por tubos (metálicos ou plásticos) de entrada do líquido de perfusão e tubo de saída para o dialisado. A membrana semipermeável aparece na porção terminal entre esses tubos, que possuem sílica fundida e possibilitam que as membranas sejam constantemente perfundidas com o líquido de perfusão. Estas membranas são feitas de material do tipo acetato de celulose ou poliéster carbonato, apresentando um tamanho de poro (*cut off*) que varia entre 6 e 100 kDa, limitando a passagem de moléculas (MUNARI, 2006; PLOCK; KLOFT, 2005).

As sondas podem se apresentar em três diferentes formatos: concêntrica, linear e *shunt* e são empregadas em regiões específicas, dependendo da finalidade do estudo (Figura 7).

Figura 7 - Sondas de microdiálise nos formatos concêntrica (A), linear (B) e shunt (C).



Fonte: Adaptado de NANDI; LUNTE (2009).

As sondas concêntricas são utilizadas normalmente para estudos neuroquímicos. Devido à região cerebral ser extremamente heterogênea e um tecido rígido, esta necessita de uma sonda de tamanho muito pequeno para garantir resolução espacial dentro de uma área específica, sendo implantadas com o auxílio de uma cânula guia. O tamanho para as sondas utilizadas em ratos é de cerca de 250–500 μm de diâmetro, sendo diferente das implantadas em camundongos, que apresenta tamanho entre 220 e 380 μm . O tamanho das membranas varia de 1 a 4 mm, e por serem rígidas, não devem ser implantadas em órgãos internos de animais com movimento livre, pois pode haver dano à membrana ou ruptura de parede de vasos do animal (DAVIES et al., 2000; NANDI; LUNTE, 2009).

As sondas lineares por serem flexíveis são empregadas para implantação em tecidos não rígidos e homogêneos, tais como pele e músculo. Apresentam membrana entre 4 e 10 mm, que está inserida entre duas cânulas flexíveis, sendo facilmente implantada em órgãos internos de animais em movimento, visto que durante o experimento, a flexibilidade das cânulas confere uma chance mínima de ruptura de vasos. As sondas *shunt* são empregadas para MD que avalia fluidos em movimento. Uma de suas utilizações é através da implantação realizada no ducto biliar, onde é realizada uma amostragem de bile em animal acordado e com livre movimento (DAVIES et al., 2000; NANDI; LUNTE, 2009).

Mesmo havendo tipos diferentes de sonda para facilitar a implantação em determinados órgãos, há uma grande dificuldade comum a todos os tipos, que é a capacidade de determinar a quantidade de molécula que pode ser recuperada pela membrana, visto que sofre influência do fluxo e características do líquido de perfusão, tipo de molécula e área superficial da membrana (PEDRONI, 2005). Assim, é imprescindível o entendimento da recuperação relativa dessa sonda, que significa a quantidade do fármaco em estudo no dialisado coletado. Isso permitirá calcular a concentração real do fármaco no local de inserção da sonda (LIETSCHE et al., 2014).

A recuperação pode ser do tipo diálise (por ganho) *in vitro* e retrodiálise (por perda) *in vitro* e *in vivo*. A recuperação por diálise consiste em inserir a sonda de MD em uma solução do fármaco em estudo de concentração conhecida (C_{ext}), o líquido de perfusão, que mimetiza o fluido extracelular, é perfundido através da sonda, onde ocorre o processo de difusão (ARAÚJO et al., 2008). E através da equação 1 (ver item do referencial teórico) pode ser determinada a recuperação da sonda.

A retrodiálise consiste em inserir a sonda de MD numa solução do líquido de perfusão e uma solução do fármaco em estudo, de concentração conhecida, é perfundida através da

sonda (C_{perf}) (ARAÚJO et al., 2008). E a equação 2 (ver item do referencial teórico) determina a recuperação da sonda por retrodiálise.

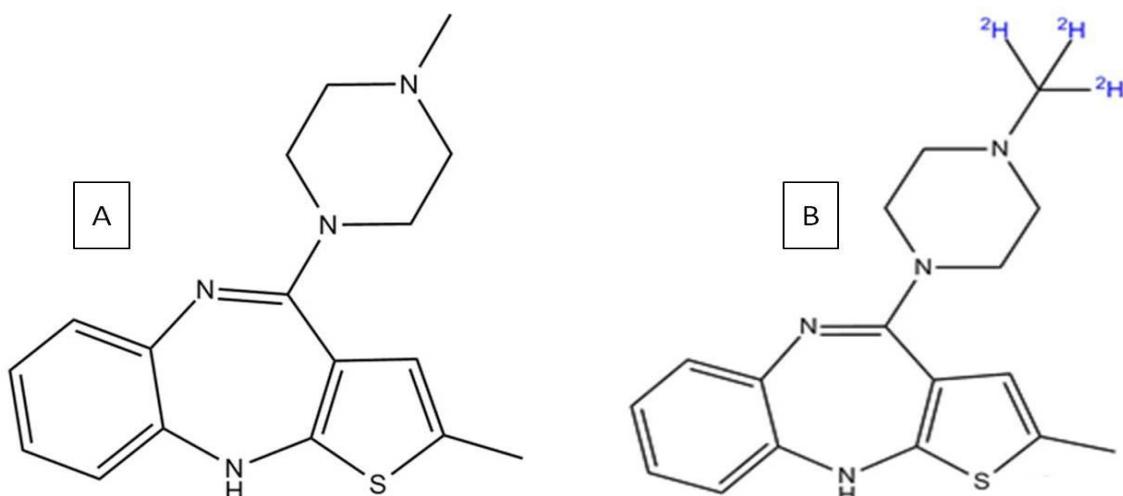
Este capítulo diz respeito à produção de sondas de MD cerebral em laboratório e avaliação da sua eficiência de recuperação *in vitro* comparando com a eficiência de recuperação de uma sonda comercial. Além de desenvolvimento e validação de um método cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-EM/EM) para quantificar amostras de OLZ em líquido de perfusão provenientes dos experimentos de recuperação.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Substâncias químicas e reagentes

A substância química de referência da OLZ foi adquirida da *United States Pharmacopeial Convention* (Rockville, MD, USA) e a OLZ D₃, utilizada como padrão interno (PI) (Figura 8), foi obtida da *Artmolecule* (Poitiers, France). Amostra de OLZ doada pela empresa Cristália (Lote: G0L368), São Paulo, Brasil. Ácido fórmico, acetonitrila e metanol (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA), todos com grau CLAE. A H₂O foi purificada com sistema MilliQ® (Millipore, Molsheim, France). Líquido de perfusão para estudos em tecidos cerebrais composto por NaCl 147 mM, KCl 2,7 mM, CaCl₂ 1,2 mM e MgCl₂ 0,85 mM (CMA/Microdialysis AB, Estocolmo, Suécia).

Figura 8 - Estrutura química da olanzapina (A) e olanzapina D3(B).



Fonte: <http://www.alsachim.com/>

4.2.2 Material para confecção de sondas

Cola epóxi, agulhas hipodérmica 22g x 1 ½" (BD, Minas gerais, Brasil), sílica fundida polymicro TSP 075150 (Polymicro Technologies, Arizona, EUA), microretíficaDremel série 3000 com disco de corte de 24 mm (Dremel, Illinois, EUA), membranas de diálise de polietersulfona (fibras de dialisadores) e ponteiras para micropipetas (Eppendorf, São Paulo, Brasil), sonda CMA 12, FEP (copolímero de tetrafluoroetileno e hexafluoropropileno) tubos e seus conectores (CMA/Microdialysis AB, Estocolmo, Suécia).

4.2.3 Equipamentos

Bomba de perfusão CMA 402 syringe pump e acessórios, coletor de amostras CMA 142 Microfraction Collector (CMA/Microdialysis AB, Estocolmo, Suécia), banho de ultrassom Q335D (Quimis, São Paulo, Barsil), agitador de tubos AP59 (Phoenix, Araraquara, Brasil).

4.2.4 Confecção de sondas

As sondas preparadas em laboratório foram confeccionadas adaptando a metodologia de Lietsche e colaboradores (2014) e Bazzu e colaboradores (2011) e são do tipo concêntricas, visando o estudo onde a implantação ocorre em uma região do cérebro.

4.2.4.1 Procedimento:

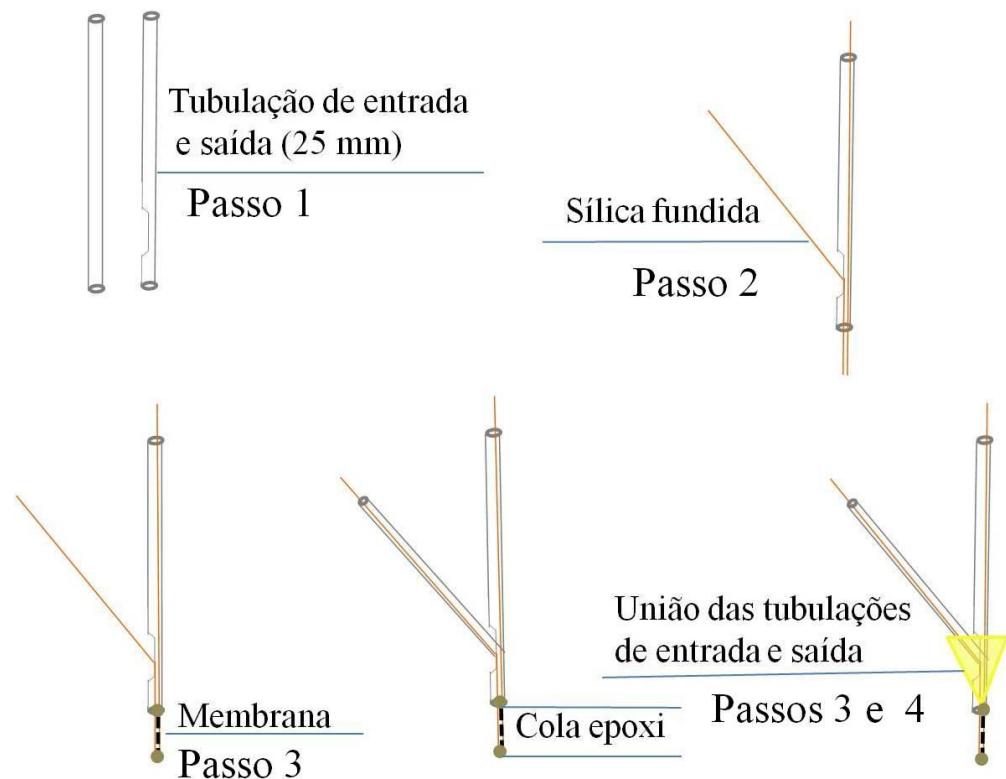
1. As tubulações de entrada e saída foram confeccionadas a partir de agulhas no tamanho de 25 mm. A tubulação de entrada deve conter uma pequena abertura de 1 mm na distância de 5 mm de uma das extremidades, no entanto deve ser resistente o suficiente para evitar ruptura da agulha no nível da abertura;
2. Duas unidades de sílica fundida de \pm 40 mm foram inseridas na tubulação de entrada e coladas de modo que cerca de 5 mm ficassem para fora da extremidade da tubulação de entrada. Uma das sílicas deve ser inserida pela abertura citada anteriormente e permanecerá angulada para posterior inserção da tubulação de saída;
3. A membrana de diálise foi inserida nas sílicas do tubo de entrada e ajustada para permanecer com uma área de 4 mm e a outra extremidade foi fechada com cola epóxi;

4. A tubulação de saída foi inserida na sílica angulada e foi unida à tubulação de entrada através de uma parte de ponteira de micropipetas no tamanho de ± 1 cm e cola epóxi;

5. Cada sonda foi mantida *overnight*, em local que não sofresse impacto, para garantir uma boa fixação dos componentes e testadas antes do uso.

A seguir é apresentado um esquema de confecção da sonda (Figura 9). As agulhas utilizadas nas tubulações de entrada e saída servem para proteção da sílica. O funcionamento da sonda só foi testado após 12 h para garantir que todas as partes estejam bem fixadas e que a cola esteja completamente seca.

Figura 9 - Esquema de confecção das sondas em laboratório.



Fonte: Autoria própria.

4.2.5 Método de quantificação da olanzapina

A quantificação da olanzapina em líquido de perfusão foi realizada utilizando um método desenvolvido por CL-EM/EM.

4.2.5.1 Condições cromatográficas e espectrométricas

O sistema CLAE (Shimadzu Corporation, Kyota, Japan) consistiu em autoinjetor (SIL-30AC), bomba binária (LC-30 AD), degaseificador (DGU-20A3) e forno (CTO-20A). O espectrômetro de massas utilizado foi AB Sciex-3200 triplo quadrupolo (MDS-SCIEX, Toronto, Canadá). A ionização dos compostos foi realizada à pressão atmosférica por *eletrospray* em modo positivo e a transição de massas pelo monitoramento de reações múltiplas (MRM) para detecção da OLZ e PI foi m/z 313,1 > 256,1 e 316,2 > 256,1 respectivamente. O software utilizado para aquisição e processamento dos dados foi Analyst 1.4.1 (SCIEX).

A fase móvel foi formada de amônio 5 mM: metanol, ambos com 0,1% de ácido fórmico (45:55 v/v) em modo isocrático no fluxo de 0,5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$. A fase estacionária foi coluna cromatográfica ACE C18 125 × 4,6 mm, 5 μm (ACE, Aberdeen, Scotland, UK) com pré-coluna Gemini C18 2 × 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). O forno foi mantido à temperatura ambiente (21–23°C). O volume de injeção foi de 10 μL . Os tempos de retenção para OLZ e PI foi 3,18 min, sendo o tempo de análise de 4 min.

4.2.5.2 Soluções padrão

As soluções de trabalho de OLZ e PI foram preparadas a partir de soluções estoque (1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) através de solubilização e diluição em metanol nas concentrações (100, 10 e 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) para OLZ e 100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ para o PI. As soluções da curva de calibração e as soluções dos experimentos de recuperação foram preparadas através da fortificação do líquido de perfusão branco com soluções de trabalho em diferentes concentrações (0,625; 1,25; 3,125; 6,25; 12,5; 25,0 e 50,0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$). As soluções de controle de qualidade (CQ) foram preparadas em líquido de perfusão nas concentrações 1,25, 12,5 e 80 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (baixo [CQB], médio [CQM] e alto [CQA], respectivamente). Todas as soluções foram armazenadas a 4°C até sua utilização (BEDOR et al., 2015).

4.2.5.3 Preparo das amostras

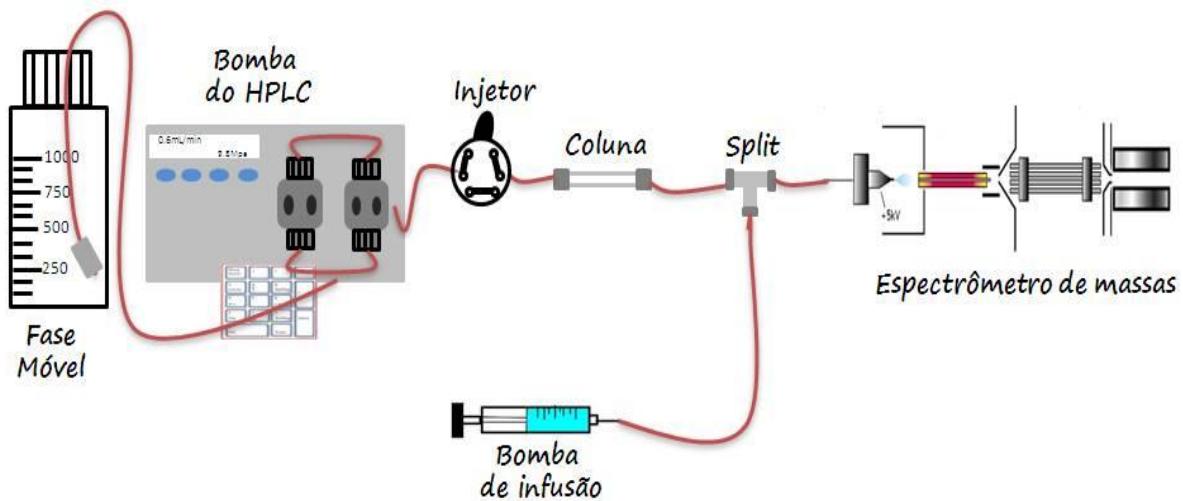
As amostras coletadas na recuperação eram diluídas com solução de PI, sempre na concentração de 20% da concentração utilizada no experimento para solução de OLZ, a fim

de garantir um volume de amostra suficiente para o rack de *vials* disponível para o equipamento.

4.2.5.4 Validação

A validação do método foi realizada em conformidade com os requisitos atuais da ANVISA (RDC n.º 27, de 17 de maio de 2012), sendo realizados testes de seletividade, linearidade (0,625 a 100 ng·mL⁻¹), precisão e exatidão. O efeito matriz foi realizado através de infusão pós-coluna com solução de OLZ em líquido de perfusão (50 ng·mL⁻¹) e foi injetada uma amostra branco (líquido de perfusão) (Figura 10).

Figura 10 - Representação esquemática da configuração do sistema CL-EM/EM no experimento de efeito matriz.

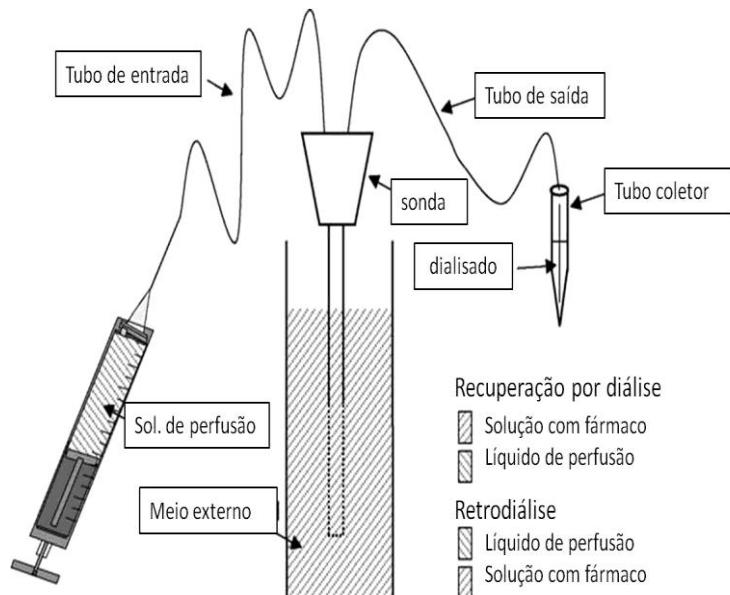


Fonte: Autoria própria.

4.2.6 Recuperação *in vitro* das sondas de microdiálise

A recuperação *in vitro* das sondas de microdiálise foi realizada através de experimentos por diálise e retrodiálise. Um esquema é mostrado na figura 11 a seguir.

Figura 11 - Esquema para recuperação por diálise e retrodiálise.



Fonte: Adaptado de PLOCK; KLOFT (2005).

Na recuperação por diálise, a sonda de MD foi inserida em uma solução de OLZ de concentração conhecida sob agitação a 37°C e o líquido de perfusão foi perfundido através da sonda em determinado fluxo na ordem de $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. E através da equação 1 (ver item do referencial teórico) foi determinada a recuperação da sonda. Para a retrodiálise, a sonda foi inserida numa solução do líquido de perfusão sob agitação a 37°C e uma solução de OLZ de concentração conhecida foi perfundida através da sonda em determinado fluxo. A equação 2 (ver item do referencial teórico) determina a recuperação da sonda por retrodiálise.

Para avaliar a qualidade das sondas produzidas no laboratório, a recuperação por diálise *in vitro* das sondas foi realizada através da investigação da influência de dois fatores: fluxo (1, 2 e 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) e concentração de solução de OLZ (12,5, 25 e 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). Um planejamento fatorial composto central de face centrada, mostrado na Tabela 2 foi elaborado. Após a concretização de todos os experimentos, foi desenvolvido um modelo matemático a fim de relacionar a resposta investigada (recuperação das sondas) com os fatores (fluxo de perfusão e concentração de solução de OLZ).

Tabela 2 - Planejamento composto central de face centrada utilizado na etapa de recuperação *in vitro*. Entre parênteses estão os níveis dos fatores codificados.

Níveis dos fatores	
Fluxo	Concentração
OLZ	
1 (-1)	12,5 (-1)
1 (-1)	50 (+1)
3 (+1)	12,5 (-1)
3 (+1)	50 (+1)
1 (-1)	25 (0)
3 (+1)	25 (0)
2 (0)	12,5 (-1)
2 (0)	50 (+1)
2 (0)	25 (0)
2 (0)	25 (0)
2 (0)	25 (0)
2 (0)	25 (0)

A recuperação por retrodiálise foi realizada a partir dos resultados da recuperação por diálise, utilizando o melhor fluxo de perfusão frente às três diferentes concentrações de solução de OLZ (12,5, 25 e 50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$). E os resultados foram comparados estatisticamente através de teste *t student*.

Todas as soluções de OLZ foram feitas em líquido de perfusão. O tempo de equilíbrio em ambas as recuperações foi de 60 min e foram realizadas coletas a cada 20 min durante 120 min.

A fim de realizar uma comparação entre uma sonda feita em laboratório e uma sonda comercial CMA 12, foi realizado o experimento de diálise e de retrodiálise (nas melhores condições encontradas pelo planejamento experimental) entre as sondas. Informações sobre as características das sondas utilizadas nos experimentos são apresentadas na tabela 2.2.

Tabela 3 - Características da sonda comercial e de laboratório

Características	Sonda comercial	Sonda de laboratório
Tamanho da membrana	4mm	4-5mm
Tipo de membrana	Polietersulfona	Poliariletersulfona
<i>Cutoff</i>	20 kDa	20 kDa
Diâmetro da membrana	0,5 mm	0,5 mm

4.2.7 Adsorção aos tubos plásticos da microdiálise

Para avaliar a adsorção da olanzapina aos tubos de plástico do sistema de microdiálise/recuperação *in vitro* foi utilizado o tubo FEP com dimensões de 150 mm nas mesmas condições do experimento que apresentou melhor recuperação. Seguindo o método de recuperação por retrodiálise, uma solução de OLZ na concentração de 50 ng·mL⁻¹ em líquido de perfusão foi perfundida através de um tubo FEP no fluxo de 1 µL·min⁻¹ durante um tempo de equilíbrio de 1 h e em seguida foram realizadas coletas a cada 20 min durante 60 min (LINDBERGER et al.; 2002; NIROGI et al., 2012). O experimento foi realizado em duplicata, a equação 2.1. foi utilizada para calcular a adsorção ao tubo (L).

$$L = 1 - (C_{\text{obtido}} | C_{\text{perfusato}}) \times 100 \quad (4)$$

4.2.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA), teste *t student* e os gráficos de superfície resposta foram obtidos através do software *Statistica* 10 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Confecção de sondas

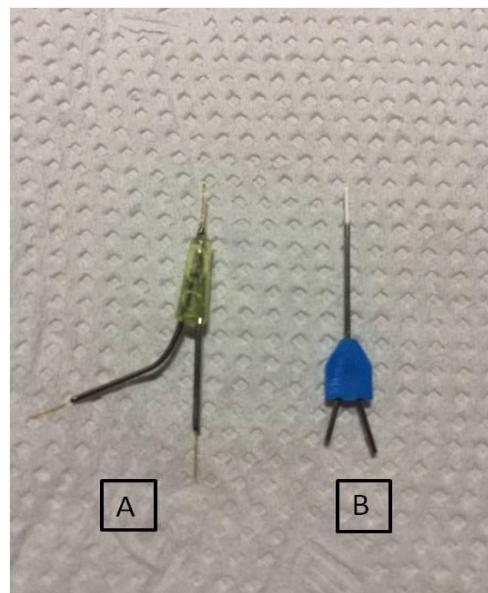
As sondas feitas em laboratório apresentam um custo de fabricação muito abaixo do valor empregado para a compra de uma sonda comercial, cerca de R\$ 5,00, pois os materiais utilizados podem ser adquiridos facilmente no mercado. O tempo gasto para confecção das

sondas não se torna alto, desde que a mão de obra tenha sido treinada e tenha percepção e sensibilidade para trabalho manual com materiais de tamanhos milimétricos. Em cerca de 1 h é possível obter 5 sondas, no entanto se faz necessário considerar o tempo de secagem *overnight* e 80% das sondas confeccionadas estão aptas ao uso, exibindo recuperação em torno de 19% de acordo com os resultados apresentados a seguir.

Segundo Munari (2006), as sondas confeccionadas em laboratório são vistas como uma desvantagem devido ao tempo de confecção ser demorado e os materiais apresentarem alto custo, tornando o processo de produção até mais caro do que a compra através de uma empresa fornecedora de sondas comerciais.

No entanto, diante dos resultados apresentados aqui, que corroboram com Lietsche e colaboradores (2014), pode ser afirmado que as sondas confeccionadas em laboratório servem como uma alternativa às sondas comerciais, no que diz respeito ao funcionamento, custos de material para confecção e eficiência de recuperação. Isso enfatiza a possibilidade da redução dos custos da técnica de microdiálise, possibilitando que grupos de pesquisa utilizem diferentes artifícios para produção dos seus próprios materiais de pesquisa com qualidade. A figura 12 apresenta o design de uma sonda feita em laboratório e uma sonda comercial utilizada no nosso estudo.

Figura 12 - Design uma sonda de microdiálise feita em laboratório (A) e uma sonda comercial CMA (B).



Fonte: Autoria própria

4.3.2 Método de quantificação da olanzapina

O método desenvolvido e validado apresentou seletividade sem interferentes endógenos ou metabólicos nos tempos de retenção da OLZ e do PI (Figura 13). A linearidade foi obtida a partir da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ponderada (weighted *Linear least-square regression analysis*) com mais de uma ordem de grandeza, na faixa de 0,625 a 100 ng·mL⁻¹ (1/x), com média de coeficiente de determinação de 0,9962 (n = 3 corridas analíticas) (Figura 14). A precisão intra e interdia foi de 8,9 e 12,8 %, respectivamente e o erro relativo é de 11,2 %. Os resultados obtidos mostraram-se dentro dos limites aceitáveis pela ANVISA (BRASIL, 2012).

Figura 13 - Cromatogramas do dialisado branco (A) e dialisado branco fortificado com 15 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ do PI (B).

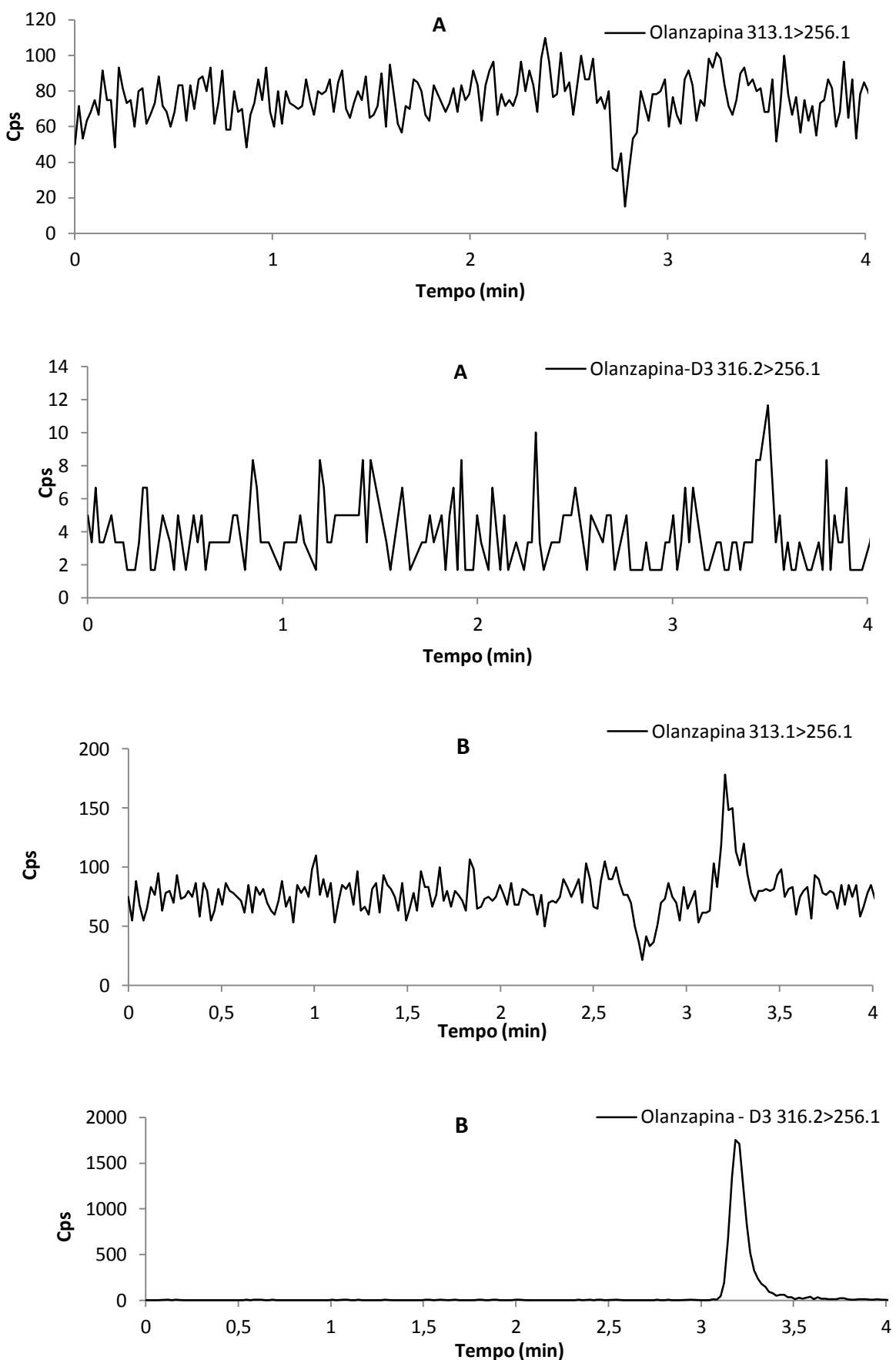
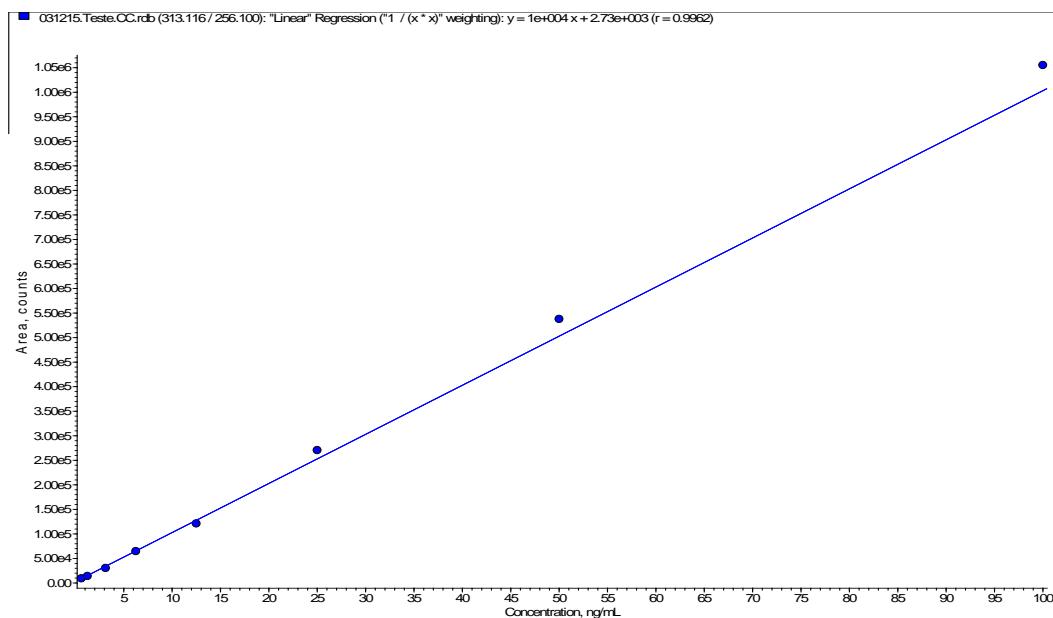


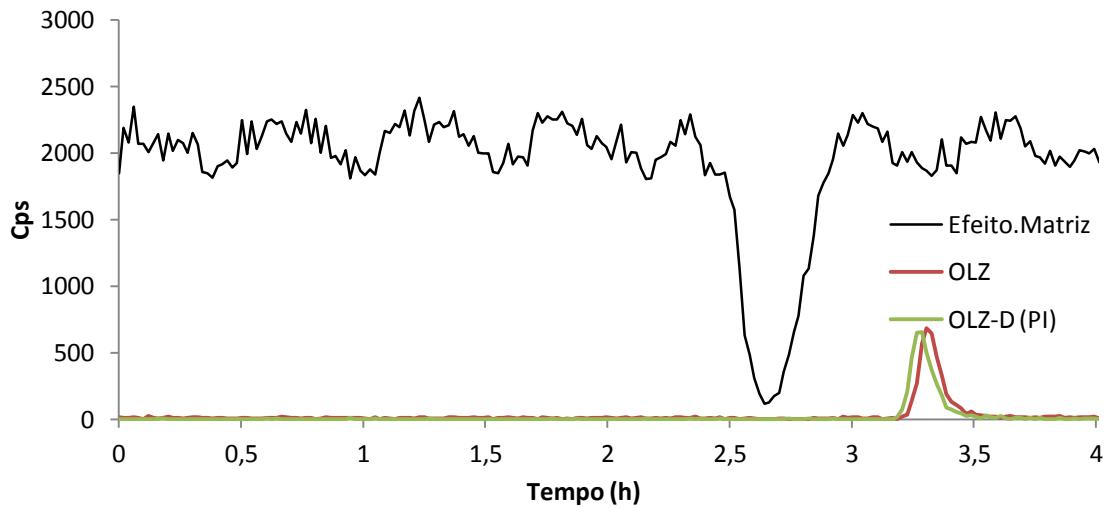
Figura 14 - Curva analítica na faixa de 0,625 a 100 ng·mL⁻¹.



Zheng e colaboradores (2012) afirmam que a injeção direta das amostras no CL-EM/EM não é adequada devido à quantidade de sal presente no líquido de perfusão e faz uso de duas colunas cromatográficas, sendo uma pré-coluna C8 que é utilizada para dessalinizar a amostra e uma coluna C18 que é utilizada para separação cromatográfica. No entanto, o estudo de efeito matriz realizado no presente método não mostrou nenhuma influência significativa do líquido de perfusão na resposta analítica da OLZ de acordo com a Figura 15, visto que nos tempos de retenção dos picos da OLZ e PI não houve alteração nos níveis de ionização.

É possível notar que as condições da fase móvel e da fase estacionária utilizadas neste método fizeram a eluição dos íons provenientes dos sais dissolvidos no líquido de perfusão no tempo entre 2,4 e 3,0 min e que os picos cromatográficos dos compostos iniciam em torno de 3,2 min.

Figura 15 - Cromatograma ilustrativo do efeito matriz.



Isso mostra que as amostras podem ser analisadas diretamente no CL-EM/EM sem necessitar de tratamento prévio, diferentemente do que é relatado por Zheng e colaboradores (2012), que afirma que o procedimento de preparo das amostras é uma etapa complicada. No presente estudo, a amostra antes de ser analisada sofreu apenas um processo de diluição com solução de PI em mesma matriz, visando apenas uma quantidade de amostra que fosse capaz de ser injetada e analisada no equipamento. Isso foi realizado devido aos baixos volumes de coleta nos experimentos de microdiálise, pois são influenciados pela recuperação da sonda, que por sua vez, é influenciada pela taxa de fluxo (ARAÚJO, 2008a).

Também foram ser observados que os valores dos tempos retenção e de análise, respectivamente (3,3 e 4,0 min), são inferiores quando comparado ao método de Zheng e colaboradores (2012), cujo valor é de 4,0 e 4,5 min, respectivamente. E ainda, o PI utilizado foi a olanzapina deuterada, que confere ao método maior confiabilidade frente à variabilidade no momento da ionização por *electrospray*. Portanto, o método aqui apresentado é considerado simples, rápido e fácil de ser reproduzido.

4.3.3 Recuperação *in vitro* das sondas de microdiálise

O planejamento composto central de face centrada foi utilizado para investigar a influencia de dois fatores, fluxo e concentração de solução de OLZ na resposta (porcentagem de recuperação da sonda) e o mesmo foi escolhido devido a estudos anteriores com este tipo de planejamento no nosso grupo de pesquisa. Os resultados estão mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados do planejamento composto central

Fluxo ($\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)	Concentração ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Resposta média (Recuperação %)	Desvio padrão
1 (-1)	12,5 (-1)	11,07	1,98
1 (-1)	50 (+1)	19,42	0,80
3 (+1)	12,5 (-1)	5,34	3,05
3 (+1)	50 (+1)	1,40	1,19
1 (-1)	25 (0)	8,59	2,61
3 (+1)	25 (0)	2,42	0,53
2 (0)	12,5 (-1)	7,95	1,27
2 (0)	50 (+1)	8,51	0,88
2 (0)	25 (0)	4,60	0,15
2 (0)	25 (0)	2,60	0,52
2 (0)	25 (0)	2,63	0,38
2 (0)	25 (0)	4,43	0,64

Supondo-se que a relação entre a resposta e os fatores investigados poderia ser representada por uma função polinomial de segunda ordem (Equação 5), foram estimados os coeficientes para construção do modelo matemático através do método dos mínimos quadrados. Os coeficientes obtidos estão mostrados na Tabela 5.

$$y = b_o + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i \leq j} b_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (5)$$

Onde: k é o número de variáveis, b_o é o termo constante, b_i representa o coeficiente dos parâmetros lineares, b_{ii} representa os coeficientes dos termos quadráticos, b_{ij} representa os coeficientes das interações entre parâmetros, x_i representa as variáveis, ε é o resíduo associado aos experimentos.

Tabela 5 - Coeficientes do modelo ajustado para resposta.

	Coeficientes	Erro	t(3)	p	- 95%	+95%
					padrão	Limite de confiança
Média	3,70979	0,5009	7,4061	0,005092	2,11566	5,30392
Fluxo (L)	-4,98639	0,4480	-11,1296	0,001554	-6,41222	-3,56056
Fluxo (Q)	1,50563	0,6720	2,2404	0,110924	-0,63312	3,64437
Conc. (L)	0,82917	0,4480	1,8507	0,161313	-0,59667	2,25500
Conc. (Q)	4,23563	0,6720	6,3026	0,008070	2,09688	6,37437
Fluxo x Conc.	-3,07458	0,5487	-5,6032	0,011233	-4,82086	-1,32830

Onde: L representa os termos lineares e Q representa os termos quadráticos. *Conc. - Concentração

Os resultados mostram que, no nível de 95% confiança, o fluxo quadrático e a concentração linear não foram considerados significativos, pois não apresentaram valor de p menor que 0,05. Realizou-se análise da variância para verificar se o modelo estava bem ajustado aos dados. Os resultados estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - ANOVA do modelo polinomial de segunda ordem inicial.

Fonte	de	Soma	Nº de G.L.	Média	F	P
variação		quadrática		quadrática		
Fluxo (L)		149,1844	1	149,1844	123,8676	0,001554
Fluxo (Q)		6,0451	1	6,0451	5,0192	0,110924
Conc. (L)		4,1251	1	4,1251	3,4251	0,161313
Conc. (Q)		47,8414	1	47,8414	39,7226	0,008070
Fluxo x Conc.		37,8123	1	37,8123	31,3955	0,011233
F.de ajuste		12,2670	3	4,0890	3,3951	0,171107
Erro puro		3,6132	3	1,2044		
Soma						
quadrática		280,3788	11			
total						
R ²		0,943				
R ² ajustado		0,896				

*F. de ajuste – Falta de ajuste

A análise de variância obtida mostrou que não houve falta de ajuste, mas confirmou que dois termos do modelo (fluxo quadrático e concentração linear) não foram considerados significativos. Portanto, tendo como base o princípio da parcimônia, estes deveriam ser excluídos do modelo. Porém, de forma a manter a hierarquia matemática, o termo concentração linear foi mantido no modelo, visto que o termo concentração quadrática foi considerado significativo (BARROS NETO et al., 2010).

Após a exclusão do fluxo quadrático, foram estimados os coeficientes para construção do modelo matemático (Tabela 7) Realizou-se outra análise de variância para verificar a falta de ajuste (Tabela 8). O modelo foi considerado adequado para fazer previsões e, a partir dele, obteve-se a curva de nível e o gráfico de superfície resposta para o modelo ajustado (Figuras 16 e 17).

Tabela 7 - Coeficientes do modelo ajustado para resposta.

	Coeficientes	Erro	t(3)	p	- 95%	+95%
					padrão	Limite de confiança
Média	4,21167	0,4480	9,4004	0,002550	2,78583	5,63750
Fluxo (L)	-4,98639	0,4480	-11,129	0,001554	-6,41222	-3,56056
Conc. (L)	0,82917	0,4480	1,8507	0,161313	-0,59667	2,25500
Conc. (Q)	4,73750	0,6336	7,4770	0,004955	2,72107	6,75393
Fluxo x Conc.	-3,07458	0,5487	-5,6032	0,011233	-4,82086	-1,32830

Tabela 8 - ANOVA do modelo polinomial de segunda ordem ajustado.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de G.L.	Média quadrática	F	P
Fluxo (L)	149,1844	1	149,1844	123,8676	0,001554
Conc. (L)	4,1251	1	4,1251	3,4251	0,161313
Conc. (Q)	67,3317	1	67,3317	55,9054	0,004955
Fluxo x Conc.	37,8123	1	37,8123	31,3955	0,011233
F.de ajuste	18,3121	4	4,5780	3,8011	0,150709
Erro puro	3,6132	3	1,2044		
Soma quadrática	280,3788	11			
total					
R ²	0,921				
R ² ajustado	0,877				

Figura 16 - Curva de nível obtida para o modelo.

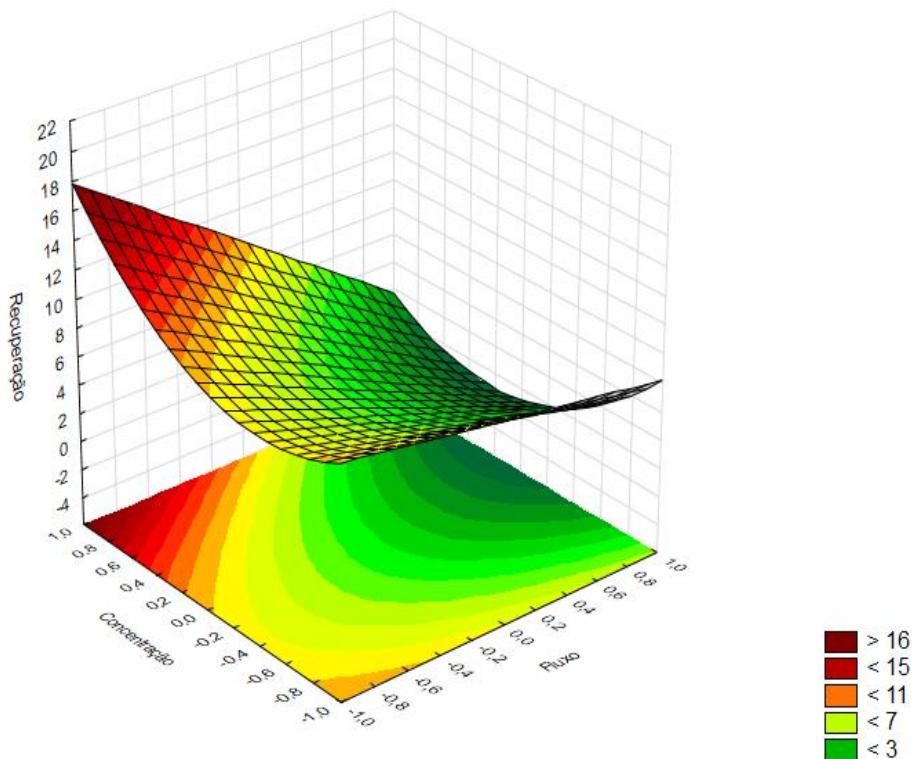
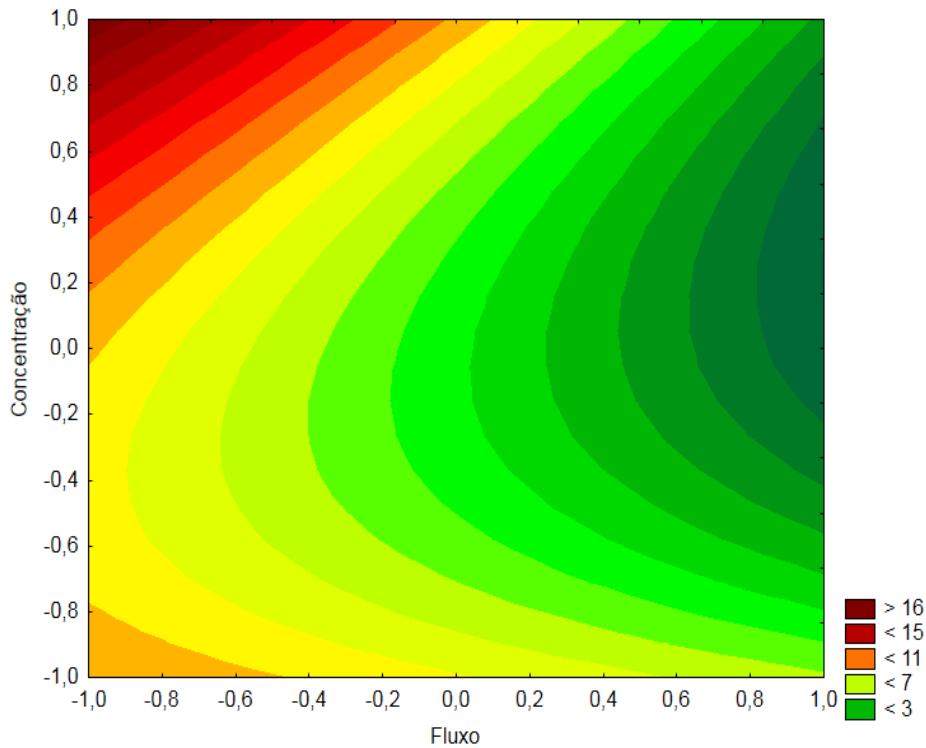


Figura 17 - Gráfico de superfície de resposta para o modelo.



Os resultados estatísticos apresentados pelo planejamento central de face centrada mostram que o fluxo e a concentração influenciam significativamente na resposta do experimento, a recuperação da sonda. No entanto, a literatura aponta que a recuperação de uma sonda não deve ser sofrer variação com a concentração, visto que no tecido *in vivo* a concentração do fármaco muda ao longo do tempo (ARAÚJO, 2008).

Realizando o tratamento estatístico para analisar as respostas em relação às diferentes concentrações, foi verificado que a resposta na concentração de $12,5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ não apresentam diferenças estatisticamente significativas, no nível de 95% de confiança (*t Student*) como já sugerido na superfície de resposta (entre os níveis -1,0 e 0,0 a região se mantém amarela, indicando mesma intensidade de resposta). No entanto, quando ambas são comparadas com a concentração de $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, há diferenças estatisticamente significativas, no nível de 95% de confiança (*t Student*), com aumento de recuperação conforme evidenciado na superfície de resposta para o modelo (entre os níveis 0,0 e 1,0 a intensidade de resposta aumenta com a passagem para níveis de vermelho).

Assim, conforme a literatura de Nirogi e colaboradores (2012), numa dose de $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ¹ (mesma dose administrada no posterior estudo de microdiálise) a concentração máxima atingida de OLZ no dialisado é de $8,4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, um valor que se encontra na região do gráfico

de superfície de resposta em que os resultados de recuperação são estatisticamente semelhantes. Essa abordagem serve para estudos posteriores de microdiálise cerebral em animais para dosagem de olanzapina.

Os experimentos de retrodiálise foram realizados a partir do fluxo que apresentou maior recuperação nos experimentos por diálise, $1\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ frente às três diferentes concentrações $12,5$; 25 e $50\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ e os resultados de recuperação por retrodiálise foram $17,50\%\pm2,98$; $16,40\%\pm3,27$ e $23,06\%\pm2,36$; respectivamente. Todos os valores de recuperação por retrodiálise foram maiores que por diálise, no entanto apresentaram a mesma tendência, sem diferenças estatisticamente significativas, no nível de 95% de confiança (*t Student*) entre as concentrações de $12,5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $25\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Quando estas concentrações foram comparadas com a concentração de $50\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, houve diferenças estatisticamente significativas, no nível de 95% de confiança (*t Student*), portanto havendo também um aumento de recuperação diante da maior concentração.

Baseado na literatura, os valores de recuperação de diálise e retrodiálise para drogas lipofílicas com $\log P$ entre 1 e 4 não são similares. Foi verificado nos experimentos apresentados que esses valores realmente diferem. Isso ocorre provavelmente devido a capacidade da OLZ, que é altamente lipofílica ($\log P 3,08$), de adsorver nos tubos do sistema de MD (LINDBERGER et al.; 2002; NIROGI et al., 2012).

O experimento de recuperação por diálise e retrodiálise (fluxo $1\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e concentração de $50\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi realizado para a sonda comercial em triplicata. Realizou-se um teste *t student* para comparar a média de recuperação entre a sonda de laboratório e a comercial nas mesmas condições. Os resultados médios para recuperação por diálise foram $19,27\%\pm10,11$ (sonda comercial) e $19,42\%\pm6,54$ (sonda de laboratório). E na retrodiálise, os resultados foram $23,06\%\pm2,36$; $24,59\%\pm3,14$ para sonda comercial e da sonda de laboratório respectivamente. Realizando uma comparação entre os valores por diálise e oura comparação entre os valores por retrodiálise, pode ser observado que não houve diferenças estatisticamente significativas, no nível de 95% de confiança (*t Student*) entre os valores de recuperação da sonda comercial e a sonda de laboratório nestas condições testadas.

Este resultado confirma que o uso de uma sonda confeccionada em laboratório apresenta a eficiência de recuperação semelhante a uma sonda comercial, enfatizando que a mesma pode ser utilizada em substituição, já que possui um custo de produção muito menor, sendo viável sua utilização na rotina de experimentos de MD cerebral.

4.3.4 Adsorção aos tubos plásticos da microdiálise

Os experimentos de adsorção ao tubo mostraram que $43,30\% \pm 3,04$ da OLZ foi adsorvida ao tubo. Os resultados corroboram com a literatura podendo confirmar que fármacos altamente lipofílicos apresentam adsorção ao tubo (LINDBERGER et al.; 2002; NIROGI et al., 2012, TER et al., 2012).

4.4 CONCLUSÕES

O método desenvolvido e validado para quantificar as amostras de olanzapina em líquido de perfusão provenientes dos experimentos de recuperação foi simples, rápido e fácil de reproduzir, apresentando a vantagem de não necessitar de tratamento prévio das amostras, sendo necessária apenas uma simples diluição para obter um volume de injeção suficiente para análise no CL-EM/EM.

A utilização de técnica de quimiometria (planejamento central de face centrada) possibilitou verificar que nos estudos de recuperação por diálise o fluxo e a concentração podem influenciar no valor de recuperação e foi observado que quanto menor o fluxo, maior é a recuperação e assim, foram definidas as faixas de melhor resposta do experimento.

Os valores de recuperação por retrodiálise são maiores que os valores de recuperação por diálise para a OLZ, o que deve ocorrer, segundo a literatura, visto que é um fármaco altamente lipofílico. E ainda, devido a sua lipofilia, a olanzapina apresenta adsorção aos tubos do sistema de microdiálise.

E pode ser comprovada, através da comparação de valores de recuperação por diálise e retrodiálise, que as sondas de microdiálise confeccionadas em laboratório apresentam a mesma eficiência de recuperação que as sondas comerciais, portanto, podem ser consideradas como um artifício para os laboratórios de pesquisa na produção dos seus próprios materiais com qualidade, reduzindo os custos da técnica de microdiálise.

4.5 REFERÊNCIAS

- Araújo, B.V.; Silva, C.F.; Haas, S.E.; Dalla Costa, T. Microdialysis as a tool to determine free kidney levels of voriconazole in rodents: a model to study the technique feasibility for a moderately lipophilic drug. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v.47, n.4-5, p.876-881, 2008.
- Barros Neto, B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E. Como Fazer Experimentos: Aplicações na Ciência e na Indústria. 4^aed. Porto Alegre, 2010. 414p.
- Bazzu, G.; Biosa, A.; Farina, D.; Spissu, Y.; Dedola, S.; Calia, G.; Puggioni, G.; Rocchitta, G.; Migheli, R.; Desole, M.S.; Serra, P.A. Dual asymmetric-flow microdialysis for in vivo monitoring of brain neurochemicals. **Talanta**, v.85, p.1933– 1940, 2011.
- Bedor, N.C.T.C.; Bedor, D.C.G.; Sousa, C.E.M.; Bonifácio, F.N.; Castelo Branco, D.M.; Leal, L.B.; Santana, D.P. The development and validation of a method for quantifying olanzapine in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.42, p. 305–313, 2015.
- BRASIL. RESOLUÇÃO RDC n.º 27, de maio 17 de 2012. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.”. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, 22 de maio. 2012.
- Davies, M. I.; Cooper, J. D.; Desmond, S.S.; Lunte, C.E.; Lunte, S.M. Analytical considerations for microdialysis sampling. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, p. 169–188, 2000.
- Lindberger, M.; Tomson, T.; Ståhle, T. Microdialysis Sampling of Carbamazepine, Phenytoin and Phenobarbital in Subcutaneous Extracellular Fluid and Subdural Cerebrospinal Fluid in Humans: An *in vitro* and *in vivo* Study of Adsorption to the Sampling Device. **Pharmacology & Toxicology**, v.91, p.158–165, 2002.
- Lietsche, J.; Gorkab, J.; Hardta, S.; Karasb, M.; Kleina, J. Self-built microdialysis probes with improved recoveries of ATP and neuropeptides. **Journal of Neuroscience Methods**, v.237, p.1–8, 2014.
- Munari, L. **Avaliação do efeito de um extrato lipofílico de Hypericum caprifoliatum Cham.& Schltdl sobre os níveis cerebrais de dopamina e seus metabólitos através de microdiálise cerebral em ratos conscientes**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2006. 161p.
- Nandi, P.; Lunte, S. M. Recent trends in microdialysis sampling integrated with conventional and microanalytical systems for monitoring biological events: A review. **Analytica Chimica Acta**, v.651, p.1–14, 2009.

Nirogi, R.; Kandikere, V.; Bhyrapuneni, G.; Benade, V.; Saralaya, R.; Irappanavar, S.; Muddana, N.; Ajjala, D.R. Approach to reduce the non-specific binding in microdialysis. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 209, p.379– 387, 2012.

Plock, N.; Kloft, C. Microdialysis: theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. **European Journal Pharmaceutical Science**, v.25, p.1-24, 2005.

Tre, E.S.; Patel, C.; Aghara, S.; Yadav, C.; Stagni, G. Optimization of perfuse pH to improve microdialysis recovery of lipophilic compounds. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 66, p. 276–280, 2012.

Zheng, Q.; Wang, F.; Li, H.; Xua, P.; Tang, H.; Li, L.; Cheng, R. Quantitative analysis of olanzapine in rat brain microdialysates by HPLC–MS/MS coupled with column-switching technique. **Journal of Chromatography B**, v.905, p.127– 132, 2012.

Farmacocinética plasmática da olanzapina e
microdiálise cerebral

5 FARMACOCINÉTICA PLASMÁTICA DA OLANZAPINA E MICRODIÁLISE CEREBRAL

5.1 INTRODUÇÃO

A olanzapina (OLZ) é um fármaco antipsicótico, classificado como atípico ou de segunda geração, que possui ação no sistema nervoso central, propiciando a melhora dos sintomas negativos da esquizofrenia e com baixa incidência de efeitos extrapiramidais (FDA, 2014). No entanto, está também associado ao ganho de peso, aumento de doenças cardiovasculares e distúrbios metabólicos, que são fatores frequentes da não adesão ao tratamento antipsicótico (LEUNG et al., 2014; MELLO, 2009). Há alguns estudos reportados na literatura que têm mostrado a relação entre o uso de OLZ e ganho de peso (MELLO, 2009; POYUROVSKY et al., 2013; VARGAS; SANTOS, 2011).

A microdiálise (MD) cerebral é uma técnica inovadora, largamente utilizada no campo da neurociência para o monitoramento da concentração de neurotransmissores (NTs), como dopamina, serotonina e noradrenalina (DARVESH et al., 2011). É realizada através da inserção de uma pequena sonda de diálise em uma região específica do cérebro que é perfundida com um líquido de perfusão específico, mimetizando o líquido cerebroespinal num fluxo constante. Isso gera um gradiente de concentração ao longo da membrana, possibilitando difusão passiva de substância, que quando coletada, traduz a concentração desta no local de inserção da sonda (MÜLLER, 2012; TSAI, 2011).

O estudo da farmacocinética permite avaliar matematicamente a influência da dose, da forma farmacêutica, da via de administração, a partir da entrada do fármaco no organismo, através da definição da sua concentração e de seus metabólitos em função do tempo utilizando cálculos dos parâmetros farmacocinéticos. E a farmacodinâmica diz respeito à concentração do fármaco e seus efeitos terapêuticos e indesejados em função do tempo (RANG; DALE, 2012).

Um melhor entendimento da relação entre concentração de fármaco no organismo e seu efeito terapêutico é um caminho para melhorar o uso de antipsicóticos em pacientes com esquizofrenia. Portanto, a relação dos dados de farmacocinética e de farmacodinâmica torna-se uma ferramenta indispensável para conferir maior conhecimento sobre a relação entre a dose farmacológica, efeito terapêutico e efeitos adversos e, ainda auxilia no desenvolvimento de novos antipsicóticos (REDDY et al., 2013).

Nesta parte da tese é abordada a técnica de MD cerebral para avaliar a concentração do NT dopamina, relacionado com o efeito farmacológico da OLZ e também o estudo de farmacocinética plasmática, a fim de definir os parâmetros farmacocinéticos da OLZ. Os estudos foram realizados em ratos, simultaneamente, após administração intravenosa de uma dose de $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de OLZ.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Substâncias químicas, solventes e reagentes

A substância química de referência da OLZ foi adquirida da *United States Pharmacopeial Convention* (Rockville, MD, USA) e a OLZ D₃, utilizada como PI foi obtida da *Artmolecule* (Poitiers, France). Amostra de OLZ (Lote: G0L368) doada pela empresa Cristália, São Paulo, Brasil. Quetamina 1mg·mL⁻¹ (St. Louis, Missouri, EUA), cloridrato de lidocaína 5mg·mL⁻¹ (Astra Zeneca, Londres, Reino Unido), pentobarbital 50 mg·mL⁻¹ (Lake Forest, Illinois, EUA), isoflurano gasoso (Piramal Critival Care, Orchard Park, NY, EUA), NaCl 0,9% e cresil violeta (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Isopentano, acetonitrila, metanol, éter etílico (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, EUA), formiato de amônio 97% (Fischer Scientific, Pittsburgh, PA, EUA), todos com grau CLAE. H₂O purificada com sistema MilliQ® (Millipore, Molsheim, França) e gelo seco (Crioexpress, Levallois-Perret, França).

5.2.2 Material

Instrumentação cirúrgica (tesouras, bisturi, pinças, agulhas), toalha de álcool, gazes e fio de sutura. Cateteres de polietileno (diâmetro interno: 0,28 mm, diâmetro externo: 0,61 mm) (Phymep, Paris, França) e (diâmetro interno: 0,58 mm, diâmetro externo: 0,96 mm) (Harvard, Les Ulis, França). Sonda concêntrica CMA 12 com membrana 4 mm mais cânula guia, líquido de perfusão para estudos em tecidos cerebrais composto por NaCl 147 mM, KCl 2,7 mM, CaCl₂ 1,2 mM e MgCl₂ 0,85 mM (CMA/Microdialysis AB, Estocolmo, Suécia), resina dental CX-PLUS cement Kit PN 1166 (Shofu, San Marcos, CA, EUA) e resina Depex 06522 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA).

5.2.3 Equipamentos

Equipamento de anestesia veterinária Univentor 400 com caixa de indução e máscara de anestesia gasosa (Univentor, Zejtun, Malta). Aparelho de estereotaxia modelo 51500 CMA 72-6335, sistema de microdiálise para animais com movimento livre CMA 120, FEP tubos e seus conectores, controlador de temperatura animal com termômetro CMA 450, equipamento para raspagem de pelos ChroMini Cordless Clipper CMA 34-1414 e broca para perfuração óssea CMA 72-4950, parafusos CMA 7431021 (CMA/Microdialysis AB, Estocolmo, Suécia), coletor automático Univentor 820 (Univentor, Zejtun, Malta). Freezer -80°C Revco (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), criostato CM 3050S e microscópio ótico (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha).

5.2.4 Animais

Ratos machos Sprague-Dawley (n = 6) provenientes do laboratório Janvier Labs (Le Genest-St-Isle, França), com peso entre 325 – 450g foram colocados em caixas individuais e mantidos em local com umidade e temperatura controlada ($23\pm2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de claro-escuro por 12h, com livre acesso a comida (4RF21, Mucedola, Milão, Itália) e água, um dia antes de iniciar os experimentos. A manipulação animal foi realizada seguindo os princípios éticos para experimentos com animais de acordo com o *National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* da França sob número 86.050.

Os animais foram submetidos, inicialmente, a cirurgia de inserção do cateter em veia e artéria femoral e em seguida, submetidos à cirurgia de estereotaxia para implantação da sonda de MD. Antes de ambas as cirurgias, administrou-se uma solução de quetamina $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ por via intramuscular e em seguida, uma solução de lidocaína $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ por via subcutânea para analgesia.

Imediatamente após os experimentos de farmacocinética plasmática e MD cerebral, o animal foi eutanasiado com administração de 1 mL de pentobarbital via intravenosa e decapitado com guilhotina para retirada do cérebro e posterior estudo histológico. Cada animal foi sacrificado isoladamente, em ambiente limpo, sendo sua carcaça armazenada em embalagem plástica apropriada e conservada em freezer -20°C até recolhimento pelo órgão competente.

5.2.5 Cirurgia para inserção de cateter em veia e artéria femoral

Os animais foram levados ao laboratório e aclimatados durante uma hora antes do início do procedimento cirúrgico. Após o procedimento de anestesia com isoflurano gasoso, colocou-se o animal em decúbito dorsal e retiraram-se os pelos da região abdominal. Uma incisão de cerca de 5 cm de largura foi feita próxima à pata esquerda para separação da veia e artéria femoral esquerda com auxílio de tesoura e pinça cirúrgica.

Fez-se um nó cirúrgico em cada extremidade de ambos os vasos a fim de evitar a circulação sanguínea. Rapidamente, perfurou-se cada vaso e inseriu-se o cateter de polietileno de menor diâmetro interno conectado a um de maior diâmetro, segundo mostrado na Figura 18. A extremidade livre de cada cateter foi fechada com agulhas identificadas para veia e artéria e a incisão, fechada com nó cirúrgico com auxílio de fio de sutura. A fim de evitar a secagem da incisão, utilizou-se 1 mL de NaCl 0,9% sempre que necessário.

Figura 18 - Cateter para inserção em veia e artéria femoral.



Fonte: Autoria própria

Colocou-se o animal em decúbito ventral e na região dorsal fez-se uma perfuração para passagem dos cateteres, que ficaram ± 10 cm expostos para facilitar a coleta sanguínea e estes foram presos, por fita adesiva, até o momento do experimento. Esse procedimento evitou que o animal mordesse os cateteres durante o tempo de recuperação do procedimento cirúrgico e de experimento.

5.2.6 Cirurgia de estereotaxia para implantação da sonda de microdiálise

Realizou-se a inserção da cânula guia para sonda de microdiálise utilizando a técnica de cirurgia de estereotaxia conforme descrito por Liu e colaboradores (2014).

Com o animal ainda anestesiado, posicionou-se o mesmo em decúbito ventral no aparelho de estereotaxia e fixou-se as orelhas nas barras laterais do equipamento. O focinho e os dentes frontais superiores foram bem encaixados na máscara da anestesia, a fim de realizar a manutenção anestésica durante todo o procedimento cirúrgico, em torno de 1 h e 30 min. A temperatura corporal do animal foi mantida através do controlador de temperatura.

Fez-se uma raspagem dos pelos da região craniana e um a limpeza com toalha de álcool para desinfecção e em seguida, fez-se uma incisão de ± 2 cm no couro cabeludo para expor o crânio. Colocou-se a cânula guia presa ao clipe do aparelho de estereotaxia, localizou-se o bregma como ponto de referência e fez-se a marcação das coordenadas estereotáxicas.

A região cerebral onde ocorreu a implantação da sonda foi o estriado, mais precisamente no núcleo da base caudado e putamem, região de grande interesse para estudos do mecanismo de ação dos antispicóticos, visto que é a região que regula o sistema motor extrapiramidal (GOODMAN; GILMAN, 2003). De acordo com o atlas de Watson e Paxinos (2013), as coordenadas estereotáxicas foram: (anteroposterior: + 0,24mm, lateral: + 0,28mm, vertical: - 0,34mm).

Com auxílio de uma broca, fez-se um pequeno orifício na região de inserção da guia cânula e outro dois para inserção de parafusos. A profundidade do orifício foi avaliada cuidadosamente para não atingir o tecido encefálico e a mesma variava com a espécie e idade do animal. Após a inserção do parafuso e da cânula guia, fechou-se a região do crânio com resina dental e o animal foi alocado numa caixa individual com água e comida *ad libitum* para recuperação por cerca de 20 horas antes da MD.

5.2.7 Avaliação Farmacocinética

A avaliação da farmacocinética plasmática foi realizada simultaneamente com a MD cerebral. Foi administrada uma dose de $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de olanzapina intravesa *in bolus* pela veia femoral, as amostras de sangue foram coletadas antes da administração da solução de OLZ e 10, 30, 60, 120, 180 e 300 min após a administração, no volume aproximado de $250 \mu\text{L}$ pela artéria femoral. Após cada coleta de amostra de sangue, 0,3 mL de soro fisiológico e 0,1 mL

de solução de heparina foram injetadas pra evitar a hipovolemia e entupimento do cateter para as coletas subsequentes.

As amostras sanguíneas foram submetidas à centrifugação a 2500 RPM (rotações por minuto) por 10 min e o plasma foi separado e armazenado em freezer a -80°C até sua análise. As amostras foram analisadas frente à curva de calibração preparada no dia de análise e controles de qualidade para monitoramento da precisão e exatidão do método durante toda a sequência analítica.

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados aplicando-se o modelo não compartmental, monocompartmental e bicompartimental. Uma das abordagens foi a estimativa dos parâmetros farmacocinéticos através da utilização de uma planilha desenvolvida no próprio NUDFAC, com o auxílio do programa Microsoft Excel®, utilizando o método dos resíduos (STORPIRTS et al., 2011).

Foi plotado um gráfico de concentração ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) x tempo (h) em escala semilogarítmica, a partir dele foram selecionados os pontos da fase terminal com maior coeficiente de determinação (regressão não linear) através da inclusão e exclusão do tempo de coleta 60 min na fase terminal e obtida a equação exponencial relativa à fase de eliminação (6):

$$C = B \times e^{-\beta t} \quad (6)$$

Onde: C é a concentração no tempo determinado, B é o ponto de interseção no eixo das ordenadas, β é constante de eliminação e t é tempo.

A partir da equação 5 gerada foram extrapoladas as concentrações para os tempos da fase de distribuição do fármaco, os valores extrapolados foram subtraídos dos resultados experimentais originando a reta corrigida da fase de distribuição (equação 7).

$$C = A \times e^{-\alpha t} \quad (7)$$

A partir da reta representativa da fase de distribuição foram obtidas a constante de distribuição (α) e o ponto de interseção com eixo das ordenadas (A), representativo da concentração no tempo 0h.

A meia vida de distribuição foi calculada pela relação $t_{1/2} = 0,693/\alpha$ e a meia vida de eliminação pela $t_{1/2} = 0,693/\beta$.

A área sob a curva até a última concentração quantificada (ASC_{0-t}) foi calculada pelo método dos trapezoides, a área sob a curva da última concentração determinada experimentalmente ao infinito (ASC_{t-∞}) foi calculada segundo a equação 8.

$$ASC_{t-\infty} = C_{5h}/\beta \quad (8)$$

Uma simples soma foi realizada para obtenção da área sob a curva até o infinito, como apresentada na equação 9.

$$ASC_{0-\infty} = ASC_{0-t} + ASC_{t-\infty} \quad (9)$$

O valor da depuração da olanzapina foi calculado pela equação 10.

$$Cl_T = X_0/ASC_{0-\infty} \quad (10)$$

Além desta abordagem foram utilizados programas dedicados ao cálculo de parâmetros farmacocinéticos, como o Winnolin® e o PKsolver® (ferramenta de suplemento do Excel®). Esta ferramenta visa apresentar uma interface mais amigável, fácil e rápida para análise de dados farmacocinéticos (ZHANG, 2010).

Em ambos os casos, iniciou-se com uma análise não compartmental para obtenção dos parâmetros de partida para a construção dos modelos matemáticos. De posse dos valores iniciais para os parâmetros farmacocinéticos, as análises compartmentais foram realizadas com 500 interações.

Para a escolha do modelo mais apropriado foi avaliado o valor do *Aikake Information Criterion* (AIC) que é calculado utilizando a soma dos quadrados dos resíduos, o número dos parâmetros do modelo e o número de pontos utilizados, aquele que apresentar o menor valor de AIC é assumido como o melhor modelo para os dados experimentais (BOURNE, 2002).

Com a finalidade de avaliar a planilha desenvolvida no NUDFAC, seus resultados forma comparados com aqueles obtidos utilizando os programas específicos para cálculos farmacocinéticos.

5.2.8 Método de quantificação da olanzapina em plasma de ratos

A quantificação da OLZ em plasma foi realizada utilizando um método desenvolvido e validado por CL-EM/EM segundo normas da FDA pelo laboratório INSERM U1070 da Universidade de Poitiers, França (dados não publicados).

5.2.8.1 Condições cromatográficas e espectrométricas

O sistema CLAE (Agilent, Waldbronn, Alemanha) consistiu em autoinjetor (G1313A), bomba quaternária (G1312A), degaseificador (G1322A). O espectrômetro de massas utilizado foi API 3000 (Applied Biosystems, New Jersey, EUA). A ionização dos compostos foi realizada à pressão atmosférica por *electrospray* em modo positivo e a transição de massas (modo MRM) para detecção da OLZ e PI foi m/z 313,2 > 256,1 e 316,2 > 256,1 respectivamente. O software utilizado para aquisição e processamento dos dados foi Analyst 4.1.2 (SCIEX).

A fase móvel foi composta por formiato de amônio 10 mM: acetonitrila: água (5:75:20 v/v/v), a eluição foi realizada em modo isocrático no fluxo de 0,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A fase estacionária foi coluna cromatográfica Jupiter C18 $50 \times 2,1$ mm, 5 μm e pré-coluna Gemini C18 $4 \times 4,0$ mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). O forno foi mantido à temperatura ambiente (21–23°C). O volume de injeção foi de 10 μL . Os tempos de retenção para OLZ e PI foram 1,06 min, sendo o tempo de análise de 3,5 min.

5.2.8.2 Soluções padrão

As soluções de trabalho de OLZ e PI foram preparadas a partir de soluções estoque (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) através de solubilização e diluição em metanol nas concentrações (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) para OLZ e (10, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) para o PI. As soluções da curva de calibração foram preparadas através da fortificação do plasma branco com soluções de trabalho em diferentes concentrações (0,25, 0,5, 1, 5, 25, 75 e 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). As soluções de CQB, CQM e CQA foram preparadas em plasma nas concentrações 0,5, 25 e 75 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Todas as soluções foram armazenadas a -80°C até sua utilização.

5.2.8.3 Preparo das amostras plasmáticas

Foram introduzidos 100 μ L de plasma em um tubo de vidro e centrifugou-se a 2500 RPM durante 10 min, em seguida, adicionou-se 50 μ L de solução de PI (20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) e 2 mL de éter etílico e homogeneizou-se por 30 seg em vortex. As amostras foram novamente centrifugadas a 2500 RPM por 10 min. Após centrifugação, 1,8 mL da fase orgânica foi transferido para um tubo de vidro e submetido à evaporação com N_2 na temperatura de 45°C. O resíduo seco foi resuspendedido com 120 μ L de fase móvel e submetido ao vortex por 30 seg, uma nova centrifugação a 2500 RPM por 10 min foi realizada e então, o volume foi transferido para *vial* de 250 μ L que foi disposto na bandeja do equipamento.

5.2.9 Microdiálise cerebral

Após a recuperação do animal, colocou-se a sonda de (CMA 12, 4 mm, 20kDa, *cutoff*) através da guia cânula. A entrada da sonda foi conectada através de tubos FEP à bomba de perfusão e a saída, a um coletor automático. Após este procedimento, iniciou-se o período de equilíbrio durante 60 min. O período de equilíbrio serviu para adaptação do animal ao ambiente do equipamento de MD e adaptação da sonda à região cerebral. O experimento de MD foi realizado com o animal acordado e em livre movimento.

Após o tempo de equilíbrio, iniciou-se a coleta de amostras para determinar os níveis basais de dopamina. Manteve-se o líquido de perfusão sob fluxo de 1 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e realizou-se as coletas a cada 20 min durante 120 min (totalizando 6 amostras), obtendo-se um volume de amostra de $\pm 20 \mu\text{L}$ do dialisado (MUNARI, 2006).

Após a coleta das amostras basais, administrou-se uma dose de OLZ de 3 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ por via intravenosa através da veia femoral esquerda (GRUBER et al., 2011; KOCH; PERRY; BYMASTER, 2004) e iniciou-se a coleta dos dialisados a cada 20 minutos durante 360 min, totalizando 18 amostras. As amostras de nível basal e de dialisado foram armazenadas em freezer -80°C até sua análise.

5.2.10 Histologia cerebral

A histologia cerebral foi realizada para verificar se a sonda encontrava-se inserida na região cerebral correta. Em caso, negativo, o animal era descartado do experimento. Ao final de cada experimento, sacrificou-se o animal e isolou-se o cérebro, que foi imerso em um

béquer com solução de isopentano dentro de gelo seco para rapidamente atingir a temperatura de -70°C e o mesmo foi mantido em freezer a -80°C até o momento do corte histológico.

Com o uso do criostato -20°C procedeu-se às secções coronais (40 µm) e fixação dos cortes em lâminas previamente gelatinizadas, que depois de secas, foram coradas com cresil violeta seguindo procedimento de Nissl, apresentado na tabela 9.

Tabela 9 - Protocolo de Nissl para coloração com cresil violeta.

Solução	Tempo de imersão
Coloração	
Cresil violeta	±10 min
Água destilada	2 imersões rápidas
Desidratação	
solução alcóolica 70°	Entre 30 seg e 1 min
solução alcoólica 80°	Entre 30 seg e 1 min
solução alcoólica 90°	1 min
solução alcoólica 96°	1 min
solução alcoólica 100°	2 min
Fixação	
Tolueno	10 min

As duas imersões rápidas em água destilada serviu para retirada do excesso de corante. Ao fim da coloração, procedeu-se a secagem das lâminas e para melhor fixação e proteção dos cortes histológicos, acrescentou-se uma lamínula com resina Depex. Após completa secagem e raspagem do excesso de resina, utilizou-se um microscópio ótico para verificação do local de inserção na sonda.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Cirurgia para inserção de cateter em veia e artéria femoral

A cirurgia de inserção de cateter não apresentou maiores problemas e nas figuras 19 e 20 podem ser observadas a incisão abdominal e a perfuração na região dorsal para passagem dos cateteres, respectivamente.

Figura 19 - Incisão abdominal no animal para exposição de veia e artéria femoral e inserção de cateter.

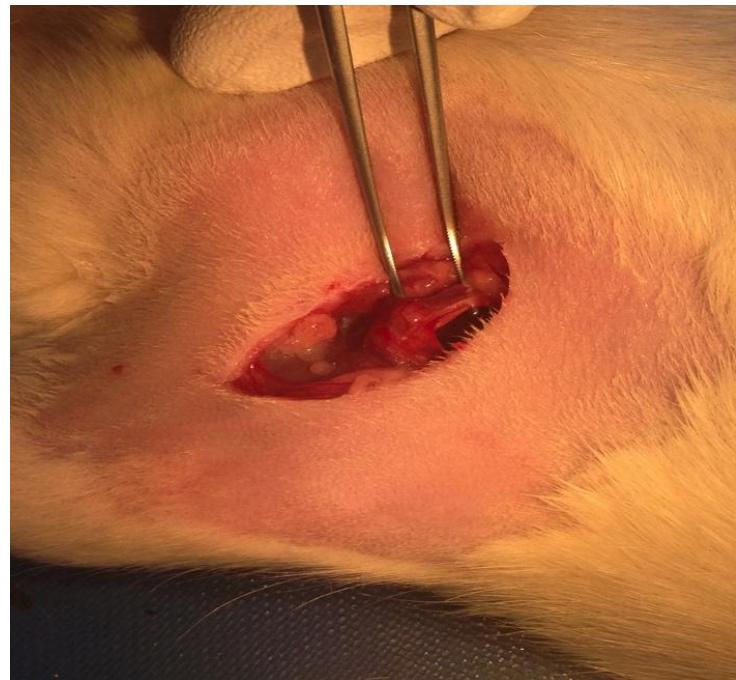


Figura 20 - Perfuração na região dorsal para passagem dos cateteres inseridos na veia e artéria femoral esquerda.



Fonte: Autoria própria

5.3.2 Cirurgia de estereotaxia para implantação da sonda de microdiálise

Para realização deste procedimento cirúrgico foi necessário um tempo maior de aprendizagem devido à cirurgia estereotáxica ser um pouco mais delicada. Ocorreram algumas condições tais como: definição correta das coordenadas estereotáxicas, que por serem milimétricas, necessitava de atenção máxima e algumas vezes foi verificado, através da histologia, que a guia cânula estava inserida com coordenadas erradas. A profundidade da perfuração no crânio necessitava de sensibilidade no manuseio da broca a fim de evitar que atingisse algum vaso cerebral, caso contrário seria necessário sacrificar o animal para evitar uma hemorragia cerebral.

Durante o período de recuperação, também foi observado que o animal retirava a resina dental que fechava o crânio após inserção da guia cânula. E devido a isso o animal necessitava ser sacrificado. Realizou-se alguns procedimentos a fim de evitar a retirada da resina, como secagem máxima da região óssea do crânio e troca de tipo de resina, mas ainda assim o problema não foi solucionado. O uso de sutura poderia ser uma boa opção de resolução do problema, no entanto, em algumas tentativas foi verificada a presença de hemorragia e inchaço no local.

A alternativa que permitiu resolver o problema foi realizar mais duas perfurações no crânio, no lado oposto de onde a sonda era inserida, para colocação de parafusos, que permitiram estabilidade extra a guia cânula e à resina, assim não houve mais perda de animal devido à remoção da guia cânula. As figuras 21 e 22 permitem observar alguns dos problemas que ocorreram durante o aprendizado de técnica de cirurgia estereotáxica.

Figura 21 - Cirurgia de estereotaxia mostrando pontos de hemorragia e perfuração de tamanho inadequado para inserção da cânula guia.

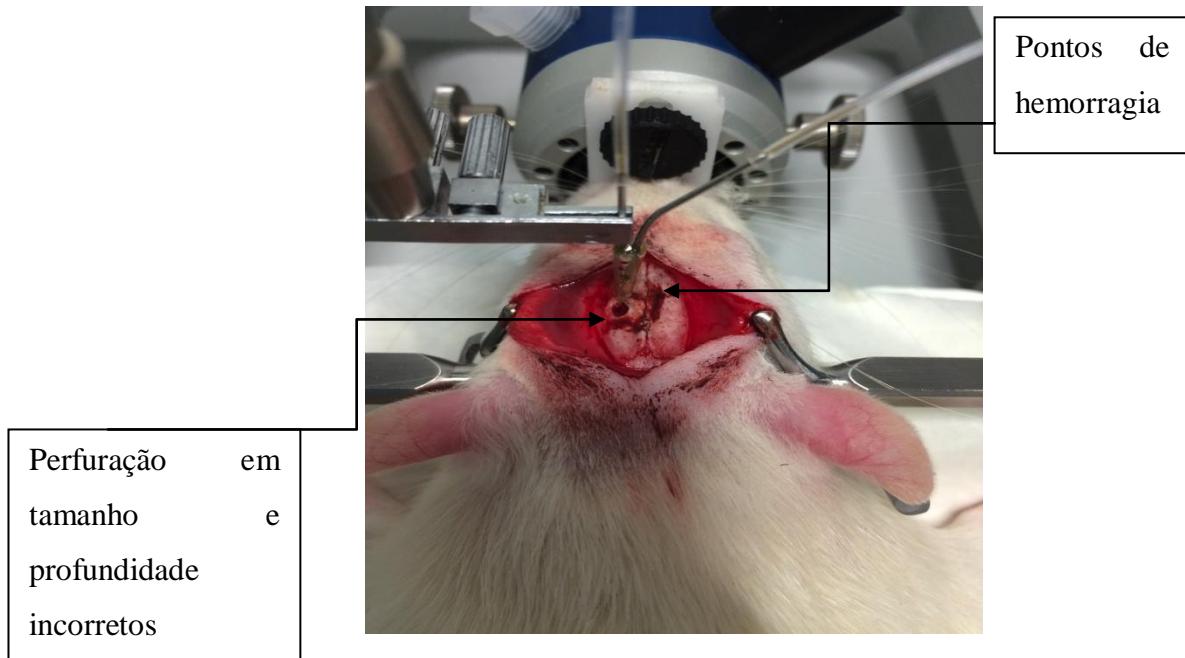


Figura 22 - Tecido cerebral com coordenadas incorretas na inserção da cânula guia.



Fonte: Autoria própria.

5.3.4 Avaliação Farmacocinética

A avaliação farmacocinética foi realizada a partir de coleta das amostras sanguíneas e separação do plasma e foi observado que os animais permaneceram estáveis, alimentaram-se e ingeriram água normalmente.

5.3.5 Método de quantificação da olanzapina em plasma de ratos

O método desenvolvido para quantificação da olanzapina em plasma de ratos apresentou-se linear, seletivo, preciso e exato (dados não publicáveis) estando de acordo com as especificações preconizadas pelo FDA.

5.3.6 Farmacocinética plasmática

Os perfis de decaimento plasmático após administração por via intravenosa proporcionam a obtenção de diversos parâmetros farmacocinéticos como concentração plasmática máxima, neste caso a concentração inicial (C_0) por não haver o processo de absorção do fármaco, a ASC_{0-t} que representa a quantidade total de fármaco no tempo estudado, a $ASC_{0-\infty}$, as constantes de velocidade envolvidas nos processos cinéticos de distribuição (α) e de eliminação (β), além da meia-vida de cada processo, depuração e volume de distribuição (STORPIRTS et al., 2011). Os dados experimentais obtidos estão descritos na tabela 10.

Tabela 10 - Concentrações de olanzapina obtidas em plasma de rato.

Tempo de Coleta (min)	R1 (ng·mL ⁻¹)	R2 (ng·mL ⁻¹)	R3 (ng·mL ⁻¹)	Média (ng·mL ⁻¹)	DP	DPR(%)
10	593,2	420,9	262,6	425,6	165,3	38,9
30	415,1	344,5	233,2	307,6	106,0	34,5
60	223,2	267,8	191,7	190,9	51,3	26,9
120	147,1	148,3	111,5	135,6	20,9	15,4
180	116,6	119,0	70,6	102,1	27,3	26,7
300	92,6	38,1	31,9	54,2	33,4	61,6

Os valores dos parâmetros farmacocinéticos são calculados a partir da elaboração de expressões matemáticas que compreendem os processos ocorridos após a administração do fármaco. As expressões matemáticas foram elaboradas a partir da abordagem da construção de modelos farmacocinéticos baseados em compartimentos (STORPIRTS et al., 2011).

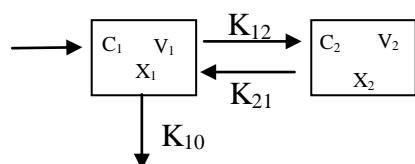
De acordo com a disposição cinética e conforme já relatado na literatura, o modelo bicompartimental (Figura 23) foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais (JOHNSON et al., 2011; OLSEN, BRENNUM & KREILGAARD, 2008), no entanto, Reddy

e colaboradores (2013) afirma que a OLZ apresenta modelo monocompartimental. Para efeito de estabelecimento do melhor modelo neste estudo o valor de AIC. Para o modelo monocompartimental o AIC foi 57,68 e para o bicompartimental foi 42,05 segundo os dois programas utilizados (PkSolver, Winnonlin), comprovando que o modelo com dois compartimentos foi o mais apropriado.

Modelos com dois compartimentos exibem um compartimento central (sangue e tecidos de maior perfusão), no qual o fármaco é distribuído imediatamente após a administração e um segundo compartimento, dito periférico (outros tecidos), para o qual o composto ativo é distribuído. Os compartimentos são interligados entre si e com o passar do tempo, o equilíbrio entre os tecidos é atingido, a velocidade de decaimento plasmática é diminuída e o processo passa a ser governado unicamente pela constante de eliminação do organismo (TOZER; ROWLAND, 2009).

O tempo para atingir o equilíbrio entre os compartimentos (t_{ss}) foi calculado a partir da relação matemática $t_{ss} = \ln(\alpha/\beta)/(\alpha - \beta)$ e resultou em 1,23h. A partir deste resultado foram selecionados os tempos 1, 2, 3 e 5h para o cálculo da constante de velocidade e meia vida de eliminação.

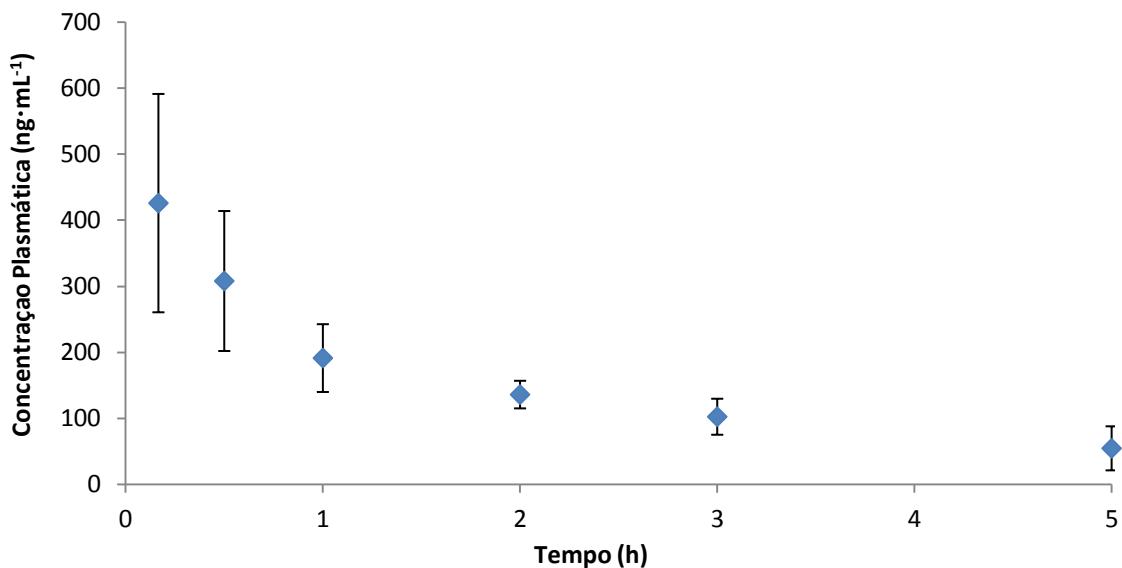
Figura 23 - Representação esquemática do modelo bicompartimental.



Onde K_{12} é a constante de velocidade de distribuição do compartimento central (1) para o periférico (2) e K_{21} , o inverso. K_{10} é a constante de eliminação do compartimento central. C_1 , V_1 , X_1 e C_2 , V_2 e X_2 são concentração, volume e quantidade no compartimento 1 e no compartimento 2, respectivamente. Fonte: Autoria própria.

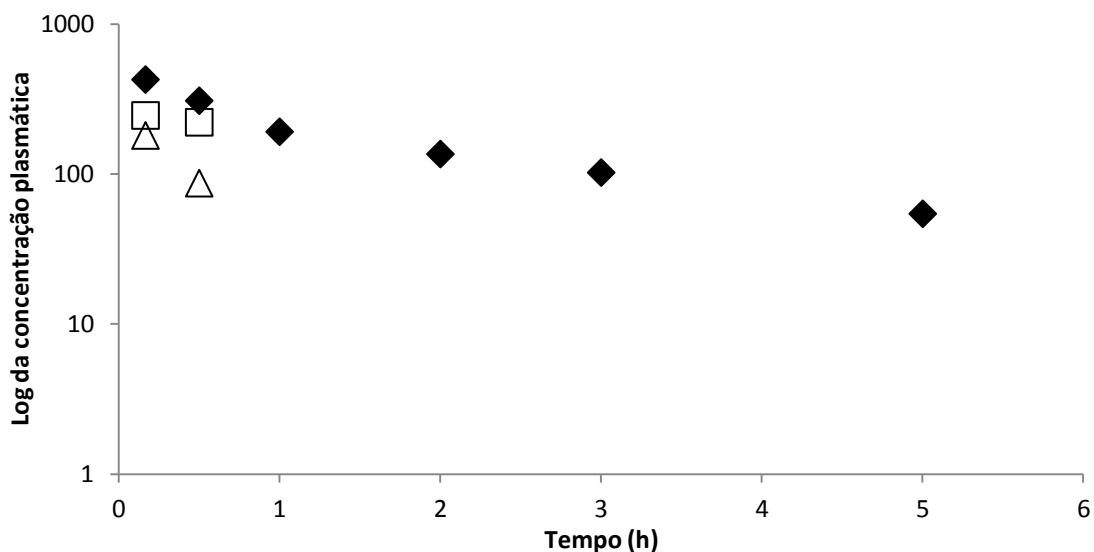
A Figura 24 mostra o decaimento plasmático médio ($n=3$). Os dados encontrados foram de acordo com relatado na literatura para OLZ em ratos na dose de $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Figura 24 - Perfil farmacocinético da olanzapina em ratos após administração intravenosa de dose $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$



O método de resíduos evidenciou a reta extrapolada para a fase de distribuição e os resíduos foram calculados gerando uma nova reta de acordo com a Figura 25. A equação representativa da fase de eliminação foi $C = 258,0 \times e^{-0,312 \times t}$, onde 0,312 corresponde à constante de velocidade de eliminação (β) e 258,0 é o ponto de interseção com o eixo das ordenadas (B). Após isso, a variável t foi substituída pelos tempos experimentais iniciais 0,166 e 0,5 e os valores extrapolados 180,4 e 86,7 foram respectivamente encontrados (□ na Figura 25). Esses resultados foram subtraídos dos valores determinados experimentalmente gerando o gráfico dos resíduos (Δ na Figura 25) que teve como equação $C=259,6 \times e^{-2,190 \times t}$, onde 2,190 é a constante de velocidade de eliminação (α) e 259,6 é o ponto de interseção com o eixo das ordenadas (A), correspondente à concentração inicial no tempo 0h (C_0). A depuração encontrada no estudo foi de 1,39 L/h.

Figura 25 - Representação gráfica do logaritmo das concentrações plasmáticas, das concentrações extrapoladas (\square) e dos resíduos (Δ).



Os resultados obtidos com a aplicação do *PKsolver* mostraram parâmetros farmacocinéticos aproximados àqueles obtidos pelo método dos resíduos. A tabela 11 mostra os resultados das concentrações experimentais bem como das previstas pelo modelo e as figuras 26, 27 e 28 mostram as representações gráficas destes dados.

Tabela 11 - Dados experimentais e previstos pelo modelo farmacocinético em plasma de ratos ($n=3$).

Time (h)	Concentração Experimental ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Ln(Conc)	Concentração	Resíduos	Ponderação
			Prevista		
			($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)		
0,166	425,6	6,053	428,2	-2,6	1
0,5	307,6	5,729	298,4	9,2	1
1	190,9	5,252	202,8	-11,9	1
2	135,6	4,910	130,7	4,9	1
3	102,1	4,626	98,0	4,1	1
5	54,2	3,993	58,5	-4,3	1

Figura 26 - Perfil farmacocinético da olanzapina em ratos após administração intravenosa de dose $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ utilizando o PKsolver.

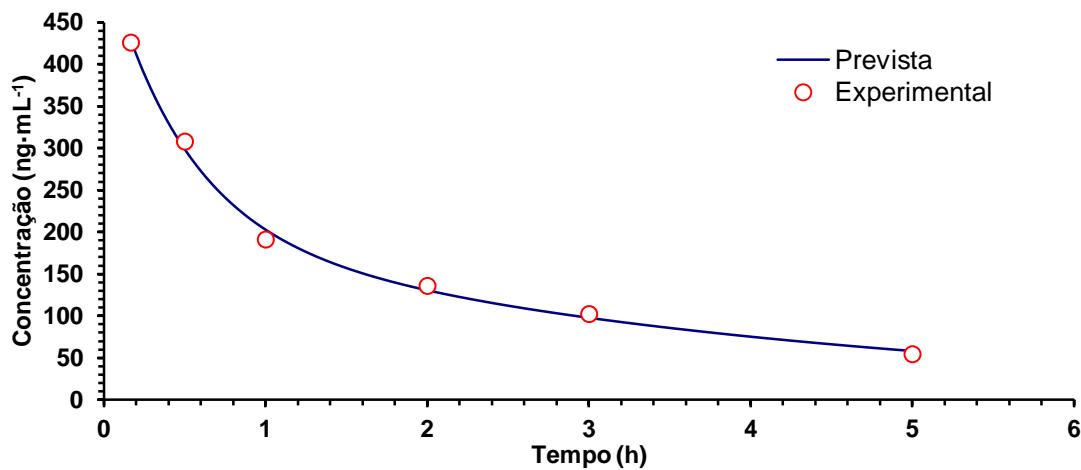


Figura 27 - Representação gráfica do logaritmo das concentrações plasmáticas.

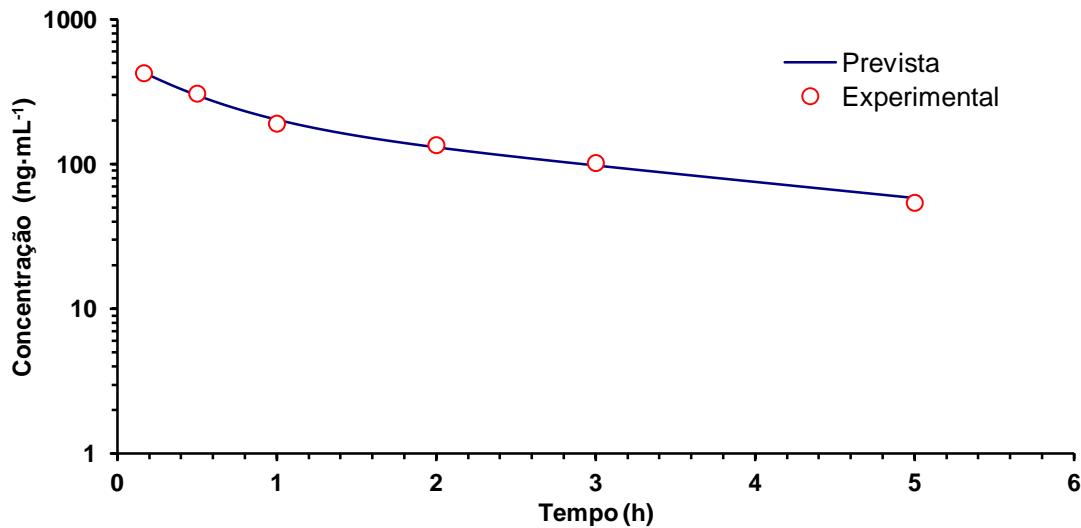
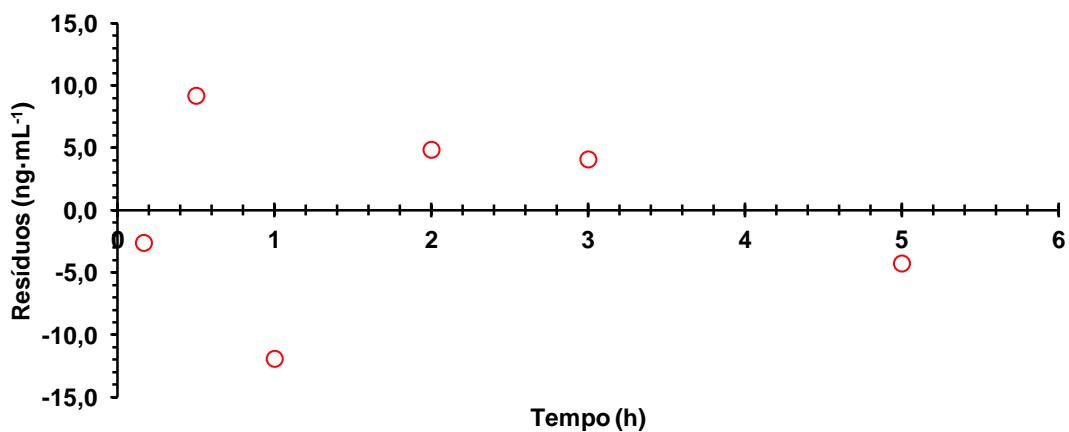


Figura 28 - Gráfico dos resíduos utilizando o PKsolver (concentração experimental – concentração prevista pelo modelo).



A tabela 12 mostra um resumo dos parâmetros farmacocinéticos obtidos pelos dois métodos de cálculo. Comprovando que as duas ferramentas geraram resultados considerados próximos.

Tabela 12 - Comparaçāo dos valores dos parāmetros farmacocinéticos utilizando as ferramentas estatísticas Excel e Pksolver.

Parāmetro	Unidade	Valores Pksolver	Valores Planilha
k10	1/h	0,543	NC
k12	1/h	0,806	NC
k21	1/h	0,968	NC
α	1/h	2,063	2,190
β	1/h	0,255	0,312
$t_{1/2\alpha}$	h	0,336	0,32
$t_{1/2\beta}$	h	2,719	2,22
C0	ng/mL	529,839	517,4
A	ng/mL	320,78	259,64
B	ng/mL	209,06	258,20
V1	mL	0,002	NC
CL	L/h	1,086	1,39
V2	mL	0,002	NC
CL2	L/h	1,613	NC
ASC 0-t	ng/mL*h	746,39	763,71
ASC 0-inf	ng/mL*h	975,68	946,12
$ASC_{0-t}/ASC_{0-\infty}$	%	76,50	80,72

*NC- não calculado

5.3.7 Microdiálise cerebral

Após definição das melhores técnicas para a cirurgia de estereotaxia, um grupo de seis animais foi separado para iniciar o experimento completo (microdiálise cerebral e avaliação farmacocinética). Deste grupo, apenas três animais foram considerados. A perda dos animais deveu-se a problemas como: o animal não resistiu durante a cirurgia ou durante o período de recuperação, verificação de inserção da sonda em local incorreto e mal funcionamento da sonda. Então, o índice de aproveitamento animal foi de 50%.

Na MD cerebral observou-se que os animais alimentaram-se e ingeriram água normalmente e estavam apenas um pouco sonolentos, no entanto, isto deve ser considerado normal, após a administração da OLZ. A figura 29 representa o experimento de microdiálise.

Figura 29 - Experimento de microdiálise



Fonte: Autoria própria

5.3.8 Histologia cerebral

A histologia cerebral seguiu protocolo de Nissl para coloração com cresil violeta e as secções coronais foram dispostas em número de 6 a 8 por lâmina microscópica, com verificação do local de inserção da sonda em microscópio óptico. Realizou-se uma comparação com o atlas de Watson e Paxinos para confirmação do local de inserção da sonda. Dos animais que foram submetidos à microdiálise, apenas um foi descartado por inserção de sonda em local incorreto. As figuras 30, 31 e 32 mostram o procedimento de secção coronal no criostato, as lâminas com os cortes histológicos e fotografia da lâmina em microscópio óptico, respectivamente.

Figura 30 - Procedimento de secção coronal.



Figura 31 - Cortes histológicos cerebrais sem coloração.

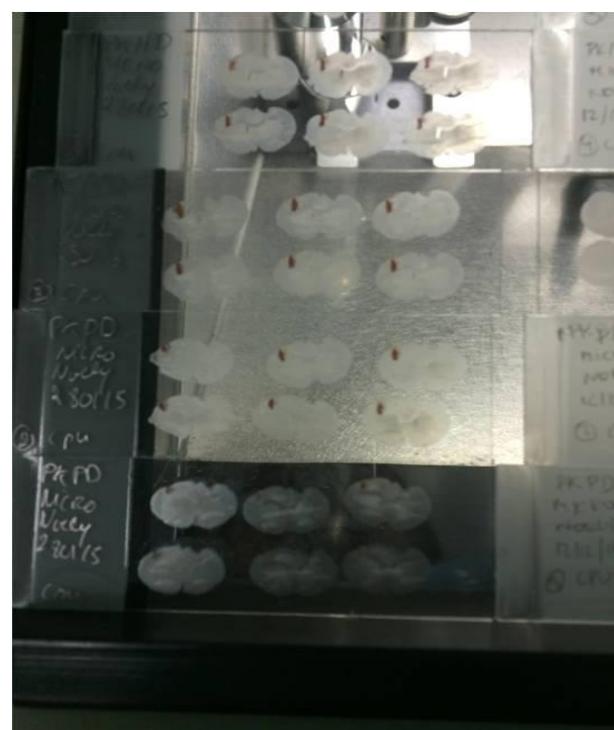
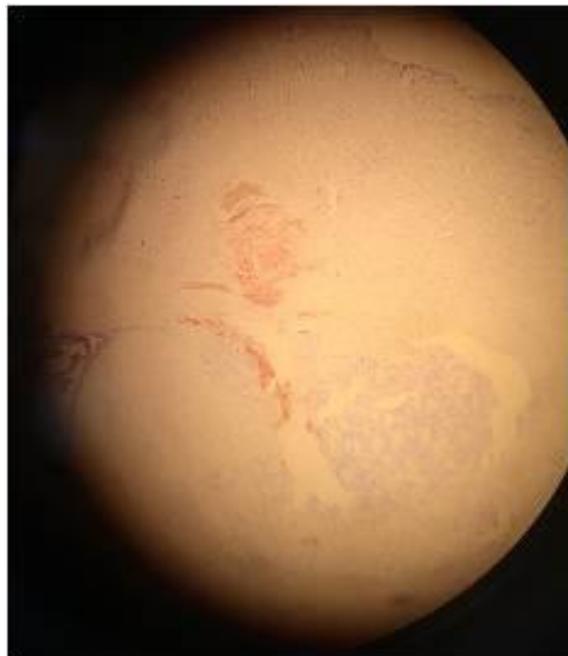


Figura 32 - Fotografias de uma lâmina em microscópio ótico. A porção alaranjada mostra o local de inserção da sonda.



Fonte: Autoria própria.

5.4 CONCLUSÕES

Ensaios farmacocinéticos pré-clínicos têm grande importância no desenvolvimento de novos fármacos e no entendimento da terapêutica de fármacos já comercializados. Para o melhor entendimento dos processos cinéticos, o estudo da concentração destas moléculas nos tecidos alvo ajuda na compreensão dos efeitos farmacológicos e toxicológicos de tratamentos, além de possibilitar a racionalização de doses e posologia.

Tratando-se de distúrbios associados ao sistema nervoso central, o aspecto técnico envolvido no acesso ao tecido cerebral para inserção de sonda é uma etapa decisiva para o sucesso do experimento.

Este trabalho proporcionou o desenvolvimento de habilidade em cirurgia estereotáxica bem como a caracterização da cinética de decaimento plasmático da olanzapina e modelagem farmacocinética com modelo bicompartmental e definição de parâmetros farmacocinéticos que corroboram com dados já publicados na literatura.

5.5 REFERÊNCIAS

Bourne, D.W.A. 2002 Chapter 12. Classical Modeling, Section IV Research Applications in Pharmacokinetics in Drug Discovery and Development Schoenwald, R.D. ed., CRC Press, Boca Raton, FL.

Darvesh, A.S.; Carroll, R.T.; Geldenhuys, W.J.; Gudelsky, G.A.; Klein, J.; Meshul, C.K.; and Van der Schyf, C.J. *In vivo* brain microdialysis: advances in neuropsychopharmacology and drug discovery. **Expert Opin Drug Discovery**, v. 6, p. 109–127, 2011.

Food and Drug Administration - FDA. US Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.DrugDetails> Acessado em fevereiro de 2014.

Food and Drug Administration - FDA. US Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM).

Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. May 2001a. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>

Goodman & Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 10^a Ed. Rio de Janeiro, 2003. 1647p.

Gruber, S.H.M.; Angelucci, F.; Nomikos, G.G.; Mathé, A.A. Effects of olanzapine on extracellular concentrations and tissue content of neuropeptides in rat brain regions. **European Neuropsychopharmacology**, v. 21, p.918–927, 2011.

Johnson, M.; Kozielska, M.; Reddy, V.P.; Vermeulen, A.; Li, C.; Grimwood, S.; Greef, R.; Groothuis, G.M.M.; Danhof, M.; Proost, J.H. Mechanism-Based Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Modeling of the Dopamine D2 Receptor Occupancy of Olanzapine in Rats. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 2490–2504, 2011.

Koch, S.; Perry, K.W.; Bymaster, F.P. Brain region and dose effects of an olanzapine/fluoxetine combination on extracellular monoamine concentrations in the rat. **Neuropharmacology**, v. 46, p. 232–242, 2004.

Leung, J.Y.T.; Pang, C.C.Y.; Procyshyn, R.M.; Barr, A.M. Cardiovascular effects of acute treatment with the antipsychotic drug olanzapine in rats. **Vascular Pharmacology**, n. 62, p. 143–149, 2014.

Liu, L.; Zhang, X.; Lou, Y.; Rao, Y.; Zhang, X. Cerebral microdialysis in glioma studies, from theory to application. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 96, p. 77–89, 2014.

Mello, M.H. **Avaliação de dados antropométricos, hemodinâmicos e metabólicos em pacientes esquizofrênicos que utilizam a olanzapina.** Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP, 2009, 96p.

Müller, M. **Microdialysis in Drug Development.** New York, 2012. 342p.

Munari, L. **Avaliação do efeito de um extrato lipofílico de Hypericum caprifoliatum Cham. & Schlehd sobre os níveis cerebrais de dopamina e seus metabólitos através de**

microdiálise cerebral em ratos conscientes. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2006. 161p.

Olsen, C.K.; Brennum, L.T.; Kreilgaard, M. Using pharmacokinetic–pharmacodynamic modelling as a tool for prediction of therapeutic effective plasma levels of antipsychotics. **European Journal of Pharmacology**, v. 584, p. 318–327, 2008.

Paxinos, G.; Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 7 ed. New York: Academic Press, 2013.

Poyurovsky, M.; Fuchs, C.; Pashinian, A.; Levi, A.; Weizman, R.; Weizman, A. Reducing antipsychotic-induced weight gain in schizophrenia: a double-blind placebo-controlled study of reboxetine–betalistidine combination. **Psychopharmacology**, v. 226, p.615–622, 2013.

Rang, H., Dale, M. **Farmacologia**. 7^a Ed. Rio de Janeiro, 2012. 808p.

Reddy, V. P.; Kozielska, M.; Suleiman, A.A.; Johnson, M.; Vermeulen, A.; Liu, J.; Greef, R.; Groothuis, G.M.M.; Danhof, M.; Proost, J.H. Pharmacokinetic–pharmacodynamic modeling of antipsychotic drugs in patients with schizophrenia Part I: The use of PANSS total score and clinical utility. **Schizophrenia Research**, v.146, p.144–152, 2013.

Storpirtis, S.; Gai, M.N.; Campos, D.R.; Gonçalves, J.E. **Farmacocinética Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro, 2011. 222p.

Tozer, T.N.; Rowland, M. **Introdução à Farmacocinética e à Farmacodinâmica. As bases Quantitativas da Terapia Farmacológica**. Porto Alegre, 2009. 336p.

Tsai, T.H. **Applications of microdialysis in pharmaceutical science**. New Jersey, 2011. 576p.

Zhang, Y.; Huo, M.; Zhou, J.; Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. **Comput Methods and Programs in Biomedicine**, v.99, p.306-314, 2010.

Estudo de bioequivalência de comprimidos de
olanzapina 10 mg em participantes de pesquisa sadios

6 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE OLANZAPINA EM PLASMA HUMANO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS E APLICAÇÃO EM ESTUDO FARMACOCINÉTICO

Apêndice A - Artigo publicado em 03/2015.

Revista “Clinical Experimental Pharmacology and Physiology”

Fator de impacto: 2,372

6.1 INTRODUÇÃO

Olanzapina (OLZ), ou 2-metil-4-(4-metil-1-piperazinil)-10H-tieno benzodiazepina (fórmula molecular $C_{17}H_{20}N_4S$), com estrutura tienobenzodiazepinil e peso molecular de 312,44 Da (ELSHAFEEY; ELSHERBINY; FATHALLAH, 2009), é uma droga antipsicótica com estrutura química e propriedades terapêuticas que são bastante similares àquelas da clozapina (FULTON; GOA, 1997). OLZ exibe eficácia terapêutica para sintomas positivos (alucinações e delírios) e negativos (pobreza de discurso e isolamento social) da esquizofrenia (BEASLEY et al., 1996; GERLACH; PEACOCK, 1995; MCCORMACK; WISEMAN, 2004; STAHL, 1999), enquanto que a primeira geração de drogas antipsicóticas (ex. fenotiazinas e butirofenonas) é apenas efetiva em tratamento dos sintomas positivos desta doença (RAGGI et al., 2001).

Recentemente, a FDA também aprovou o uso da OLZ para tratamento de mania aguda (NIROGI et al., 2006). Está comercialmente disponível em doses que variam de 2 a 20 mg, apresentando-se na forma de comprimido oral revestido (Zyprexa®), comprimido orodispersível (Zyprexa Zydis®) e injetável (Zyprexa IM®) da (Eli Lilly, Indianápolis, IN, USA) (FDA, 2014).

Inúmeras publicações sobre determinação de OLZ em fluidos biológicos estão disponíveis na literatura. Vários desses métodos empregados foram baseados no uso de CLAE com detecção ultravioleta ou eletroquímica (ARAVAGIRI et al., 1997; BAO; POTTS, 2001; BERGERMANN et al., 2004; BOULTON; MARKOWITZ; DEVANE, 2001; CATLOW et al., 1995; DUSCI et al., 2002; KASPER et al., 1999; LLORCA et al., 2001; OLESEN; POULSEN; LINNET, 2001; TITIER et al., 2003). No entanto, a deficiência presente nesses métodos é o limite de quantificação e a especificidade.

O advento da fonte de ionização à pressão atmosférica (API) foi um avanço que permitiu que a CLAE fosse acoplada a espectrometria de massas (EM), permitindo, assim, o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis (XU et al., 2007). A aplicabilidade de CL-EM/EM tem sido demonstrada em uma ampla variedade de aplicações na bioanalítica, como por exemplo, a quantificação de OLZ (BERNA et al., 2002; BOGUSZ et al., 1999; CHIN; ZHANG; KARNES, 2004; GOPINATH et al., 2012; JOSEFSSON et al., 2010; KRATZSCH et al., 2003; KOLLROSER; SCHÖBER, 2002; NIELSEN; JOHANSEN, 2009; PATEL et al., 2012; URDIGERE; BESAGARAHALLY; BASAVAIAH, 2012; ZHOU et al., 2004).

No presente estudo foi realizada uma revisão e comparação de métodos publicados de quantificação da OLZ em plasma humano (Tabela 13). Além do desenvolvimento de um rápido e sensível método usando a técnica simples de extração líquido-líquido (ELL) em combinação com análises em CL-EM/EM e então, aplicado para um estudo farmacocinético de OLZ em participantes da pesquisa sadios.

Tabela 13 - Comparaçao de métodos publicados para quantificação da olanzapina.

Droga	Matriz	Preparo da amostra	Separação	Detecção (OLZ)	Corrida analítica (min)	Faixa de Linearidade (OLZ)	Referência (Ano de publicação)
OLZ	Soro humano	EFS	(LC-APCI-MS) Fase estacionária: Superspher RP 18 (E.Merck) - (3 x 125 mm, 4 μ m) Fase móvel: Isocrático (25:75 v/v) A - acetonitrila B - Formato de amônio 50 mM (pH 3,0)	APCI-MS/MS m/z 313 > 256	7	1 - 1000 μ g·L ⁻¹	Bogusz et al., 1999.
OLZ, DCLZ, CLZ	Plasma Humano	EFS	HPLC/ESI-MS/MS Fase estacionária: Symmetry C18 (Waters) - (3 x 150 mm, 5 μ m) com pré coluna (3,9 x 20 mm, 5 μ m) Fase Móvel: Isocrático (20:80 v/v) A - acetonitrila B - ácido fórmico 0,1%	ESI-MS/MS m/z 313 > 256	6	5 - 300 μ g·L ⁻¹	Kollroser & Schober, 2002.
OLZ	Sangue Humano	ELL	LC-MS/MS Fase estacionária: MetaChem Monochrom (Varian) - (4,6 x 150 mm, 5 μ m) Fase Móvel: Gradiente (min/%B): 0,0/20; 0,1/20; 0,2/45; 5,0/70; 6,0/85; 6,1/20; 9,0/20. A - acetato de amônio 10 mM B - metanol: isopropanol: água (15:4:1 v/v/v)	ESI-MS/MS m/z 313.4 > 256.2	8	5 - 500 ng·mL ⁻¹ 1/x ²	Berna et al., 2002.
OLZ	Plasma Humano	ELL	LC-ESI-MS Fase estacionária: Hypersil BDS C18 (Thermo Scientific) - (3 x 125 mm, 3 μ m) Fase Móvel: Isocrático (78:22 v/v) A - ácido fórmico (1g·L ⁻¹) B - acetonitrila	ESI-MS m/z 313 > 256	< 5	0,1 - 200 μ g·L ⁻¹	Gervasini et al., 2003.

OLZ e DES	Plasma Humano	EFS	LC-MS/MS Fase estacionária: Luna fenil-hexil (Phenomenex) - (2 x 50 mm, 5µm) Fase Móvel: Isocrático - (98:2 v/v) A - acetonitrila - acetato de amônio (20 mM) (52:48 v/v) B - ácido fórmico - acetonitrila (0,1:100 v/v)	ESI-MS/MS m/z 312,9 > 256,0	8	0,05 - 50 ng·mL ⁻¹	Chin; Zhang; Karnes, 2004
OLZ, CLZ, RIP, QTP	Plasma Humano	ELL	LC-ESI-MS. Fase estacionária: Nucleosil® C18 (Macherey-Nagel) - (2,0 x 125 mm, 3 µm) Fase Móvel: Isocrático (53:47) A - água (ácido fórmico: 2,70 mM, acetato de amônio:10 mM) B - acetonitrila	ESI-MS m/z - 313	10	1 - 50 ng·mL ⁻¹ 1/x ²	Zhou et al., 2004.
OLZ e outros 14 neurolépticos	Plasma Humano	EFS	LC-APCI-MS Fase estacionária: LiChroCART C18 - (Merck) - (2 x 125 mm) com Superspher 60 RP Select B e pré coluna LiChroCART 10 - 2 Superspher 60 RP Select B Fase móvel: Gradiente (min/%B): 0/40; 5,5/90; 8/40; 9,5-10/40. A - formato de amônio 5 mM (pH 3) B - acetonitrila	APCI-MS m/z - 313	8,2	0,005 - 0,125 mg·L ⁻¹	Kratzsch et al., 2006.
OLZ	Plasma Humano	ELL	LC-ESI-MS/MS Fase estacionária: Inertsil® ODS - (GL Sciences) - (3,0 x100 mm, 3,0 µm) Fase Móvel: Isocrático (10:90) A - acetato de amônio 10mM B - acetonitrila	ESI-MS/MS m/z 313,4>256,4	2	0,1 - 30 ng·mL ⁻¹	Nigori et al., 2006.

OLZ	Sangue Humano	PPT	LC-MS/MS Fase estacionária: Zorbax Extend - C18 - (Agilent) - (2,1 x 50 mm, 5µm). Fase móvel: Gradiente (min/%B): 0/3; 10/80; 8/40; 9,5-10/40. A- hidróxido de amônio 5 mM (pH 9,0) e acetonitrila95:5 (v/v) B - acetonitrila	ESI-MS/MS m/z 313>256	15	0,05-0,5 mg·Kg ⁻¹ 1/x	Nielsen; Johansen, 2009.
OLZ	Plasma Humano	EFS	LC-MS/MS Fase estacionária: ACE 5 C18-300 - (ACE) - (4,6 x100 mm, 5 µm) Fase móvel: Isocrático (85:15 v/v) A - acetonitrila B - formato de amônio 2 mM com 0,01% de amônia	ESI-MS/MS m/z 313,2 >256,2	3,5	0,1 - 40 ng·mL ⁻¹ 1/x ²	Patel et al., 2012.
OLZ	Urina Humana	EFS	LC-MS/MS Fase estacionária: Symmetry C18 - (Waters) - (4,6 x 50 mm, 3,5 µm) Fase Móvel: Isocrático (10:90 v/v) A - acetato de amônio (pH =7,8) B - acetonitrila	ESI-MS/MS m/z 313,5>256,3	5	1 - 100 ng·mL ⁻¹	Urdigere; Besagarahally; Basavaiah, 2012)
OLZ e FXT	Plasma Humano	EFS	LC-MS/MS Fase estacionária: Hypersil Gold C18 - (Thermo Scientific) - (4,6 x 50 mm, 5 µm) Fase Móvel: Isocrático (10:90 v/v) A - acetato de amônio 2 mM B - metanol	ESI-MS/MS m/z 313>256	2	0,1 - 20 ng·mL ⁻¹	Bonde et al., 2014.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Substâncias químicas

A substância química de referência da OLZ foi adquirida da *United States Pharmacopeial Convention* (Rockville, MD, USA) e a venlafaxina, utilizada como PI foi obtida da *European Pharmacopoeia* (Strasbourg, France). Ácido fórmico, metil *terc*-butil éter (MTBE) e acetonitrila (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA), todos com grau CLAE. A H₂O foi purificada com sistema MilliQ® (Millipore, Molsheim, France). Amostras de plasma humano foram obtidas a partir de seis diferentes e saudáveis participantes da pesquisa e usadas separadamente para análise da especificidade e para formar um *pool* destinado à preparação de amostras de padrões de calibração e controles de qualidade.

6.2.2 Equipamentos

Secador de amostras dri-block® (Techne DB03, Staffordshire, UK) e centrífuga refrigerada Jouan M23i (St. Herblain, France) utilizados na etapa de extração das amostras, agitador de tubos AP59 (Phoenix, Araraquara, Brasil) utilizado para homogeneização das amostras e freezer a -80°C da REVCO (Asheville, NC, USA) para armazenamento das amostras até as análises.

O cromatógrafo líquido de alta eficiência consiste no sistema LC 10ADvp HPLC, equipado com duas bombas (LC-10AD VP), autoinjetor (SIL-10AD VP), sistema controlador (SCL-10A VP), forno (CTO-10A VP) e degaseificador (DGU-14A) da Shimadzu (Kyoto, Japan). A detecção de massas foi realizada com o espectrômetro de massas Quattro LC system e o controle do instrumento, aquisição, integração e cálculos foram realizados usando o software Masslinx® 4.1 (Micromass, Milford, MA, USA).

6.2.3 Método de quantificação da olanzapina em plasma humano

6.2.3.1 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas, incluindo composição da fase móvel, fluxo, fase estacionária e volume de injeção, foram otimizadas. Para a fase móvel, os solventes orgânicos, acetonitrila e metanol, foram avaliados (variando de 10 a 80%) em H₂O, além de

acetato de amônio e diferentes tampões de formato de amônio (variando de 2 a 10 mM). O ácido fórmico adicionado para aumentar a ionização foi avaliado nas concentrações de 0,05 a 0,5%. O fluxo da fase móvel foi avaliado de 0,4 a 1,2 mL·min⁻¹. Diferentes colunas cromatográficas analíticas foram avaliadas variando-se a fase estacionária (C8 e C18) e comprimento (50-150 mm), todas com diâmetro interno de 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm. O volume de injeção foi avaliado no intervalo de 2 a 30 µL. O objetivo da otimização foi obter a separação da OLZ e do PI com boa simetria do pico (entre 0,9 e 1,2) e menor tempo de análise e sem interferentes oriundos da matriz biológica.

6.2.3.2 Condições espectrométricas

Após determinação das condições cromatográficas, a ionização da fonte foi otimizada através dos ajustes da temperatura de desolvatação do gás, da distância entre o capilar e o cone de extração, do fluxo de gás entre outros parâmetros envolvidos no processo de ionização.

Para otimização do MRM avaliou-se a influência da velocidade de transmissão os íons pelos quadrupolos bem como a energia de colisão empregada para a fragmentação do íon precursor (OLZ).

Os parâmetros de ionização e de MRM foram ajustados para maximizar o sinal e minimizar o ruído, aumentando a relação sinal/ruído e conferindo maior sensibilidade.

6.2.3.3 Preparo de soluções de trabalho e padrões de controle de qualidade

Soluções de trabalho de OLZ e PI foram preparadas a partir de soluções estoque (1 mg·mL⁻¹) através de solubilização e diluição em acetonitrila nas concentrações (10, 15, 30, 60, 90, 100, 130, 160, 180 e 200 ng·mL⁻¹) para OLZ e 1000 ng·mL⁻¹ para PI. As soluções estoque e de trabalho foram armazenadas a 4°C até sua utilização.

As soluções da curva de calibração da OLZ foram preparadas através da fortificação do plasma humano branco com soluções de trabalho em oito níveis de concentrações (1, 1,5, 3, 6, 10, 13, 16 e 20 ng·mL⁻¹) obtidos usando o mesmo fator de diluição. As soluções de CQB, CQM e CQA foram preparadas em plasma humano nas concentrações 3, 9 e 18 ng·mL⁻¹, respectivamente. E para o estudo de infusão, durante a otimização da EM, a solução foi preparada na concentração 200 ng·mL⁻¹ em água:acetonitrila (1:1 v/v).

6.2.3.4 Preparo das amostras

Para o processo de extração, diferentes volumes de plasma foram submetidos à diferentes solventes, tempos de agitação e de centrifugação. Os volumes de plasma variaram entre 250, 400 e 500 µL, os solventes testados foram diclorometano, clorofórmio e MTBE, os tempos de agitação testados foram 30seg e 1 min e o tempo de centrifugação também variou de 1, 2 e 5 min.

6.2.3.5 Validação do Método

A validação do método serve para fornecer confiabilidade aos resultados e que as variações analíticas sejam mantidas dentro de limites preestabelecidos por determinados critérios que dependem da finalidade de análise, dos sistemas analíticos e dos estudos estatísticos. Todas as análises foram realizadas em conformidade com os requisitos atuais da ANVISA e FDA, descritos nas orientações para validação de métodos bioanalítico (BRASIL, 2012; FDA, 2011a).

6.2.3.5.1 Seletividade

A seletividade é um parâmetro para garantir que a quantificação do analito não sofra interferências da presença de metabólitos, produtos de degradação ou compostos endógenos. Foi avaliada através da comparação de amostras de plasma branco (amostra não fortificada), incluindo plasma lipêmico, plasma hemolisado e plasma adicionado do anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), utilizado no estudo de bioequivalência e amostras de plasma branco acrescido do PI para demonstrar a ausência de interferentes em cada ensaio. As respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% (vinte por cento) da resposta do analito nas amostras do Limite inferior de quantificação (LIQ). E inferiores a 5 % (cinco por cento) da resposta do PI. Assim, qualquer amostra branco que apresentar interferência significativa no tempo de retenção do fármaco, metabólito ou padrão interno deve ser rejeitada (BRASIL 2012).

6.2.3.5.2 Efeito matriz, Recuperação e Eficiência de processo.

O efeito matriz diz respeito à verificação de substâncias inerentes à matriz biológica que coeluem com o analito, afetando a detecção dos mesmos, já que compromete sua eficiência de ionização (MOREIRA, 2014).

O ensaio de recuperação comumente utilizado para validação de processos bioanalíticos está relacionado com a exatidão, pois diz respeito à quantidade de analito que é recuperado no processo de extração, em relação à quantidade real na amostra. Consiste na fortificação da amostra, com diferentes concentrações do analito em solução e essa concentração do analito é determinada experimentalmente (MOREIRA, 2014).

O experimento para avaliar efeito matriz, recuperação e eficiência de processo (EM, REC e EP) foi determinado usando três amostras de CQ da OLZ (CQB, CQM e CQA). O primeiro lote foi preparado em acetonitrila: água (1:1 v/v) (A), o segundo lote consistiu na extração de plasma e posterior fortificação com OLZ (1:1 v/v) (B) e o terceiro lote foi de amostras de extração de plasma fortificado com OLZ (C). A resposta da área do pico média ($n = 6$) foi utilizada para calcular EM, REC e EP. As equações estão a seguir:

$$EM(\%) = \left(\frac{B}{A} \times 100 \right) \quad (11)$$

$$REC (\%) = \left(\frac{C}{B} \times 100 \right) \quad (12)$$

$$EP(\%) = \left(\frac{C}{A} \times 100 \right) \quad (13)$$

Onde: A, B e C se referem ao preparo da amostra acima citado (MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003).

6.2.3.5.3 Linearidade

A curva de calibração ou linearidade estabelece uma relação matemática entre a resposta do instrumento (área/altura da banda cromatográfica) e a concentração do analito. Isto indica a capacidade do método de gerar resultados que sejam linearmente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma faixa analítica específica (BRASIL, 2012; FDA, 2011a).

A linearidade pode ser avaliada através da ANOVA, demonstrada através de uma equação de reta, cujo coeficiente de correlação do gráfico analítico deve ser $\geq 0,98$ e a inclinação da reta deve ser diferente de zero. Os critérios para aceitação da curva de

calibração seguem normas estabelecidas por guias de validação publicados por agências reguladoras oficiais. A curva deve possuir, no mínimo, 75% dos padrões de calibração aprovados com desvio padrão relativo (DPR) $\leq 15\%$ com relação à concentração nominal do LIQ e $\leq 20\%$ com relação aos outros padrões.

A linearidade foi avaliada usando três diferentes curvas de calibração e o coeficiente de determinação (R^2) foi calculado, juntamente, com a precisão e exatidão de cada nível de concentração da curva de calibração.

6.3.2.5.4 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão são capazes de indicar os erros de um método bioanalítico, sendo os critérios utilizados para identificar a qualidade e confiabilidade de determinado procedimento para um determinado objetivo de análise (BRASIL, 2012; FDA, 2011a).

A precisão é o parâmetro que avalia a proximidade de resultado entre as várias medidas independentes efetuadas numa amostra homogênea. Para análise de amostras biológicas, não se admite valores de DPR ou coeficiente de variação (CV%) superiores a 15% e para o LIQ, não mais que 20%.

A exatidão é definida como a concordância entre os resultados obtidos pelo método e os valores nominais das amostras, aceitos como referência. Para análise de amostras biológicas, também não se admite valores de Erro Padrão Relativo (EPR) fora da faixa de $\pm 15\%$ para os valores nominais das amostras e não mais que 20% para o LIQ.

Para precisão (DPR) e exatidão (EPR), três amostras de CQB, CQM e CQA foram preparadas, com cinco réplicas cada, analisadas no mesmo dia (precisão e exatidão intradia, $n=5$) e em três dias consecutivos (precisão e exatidão interdia, $n=15$).

6.2.3.5.5 Estabilidade das amostras

A estabilidade das amostras foi realizada para garantir que o analito permaneça estável sobre diferentes condições de preparo, análise e estocagem de amostras. Foram avaliadas as estabilidades das soluções na matriz biológica frente a ciclos de congelamento e descongelamento, das amostras processadas e a estabilidade de curta e longa duração, além das soluções estoque e de trabalho.

A estabilidade das amostras em solução e em plasma durante a validação do método foi avaliada em duas concentrações (CQB e CQA, 3 e 18 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente),

submetidas a diferentes condições. A concentração de OLZ foi comparada com aquela obtida a partir de amostras recém-preparadas, indicando o percentual de degradação.

A estabilidade em solução foi avaliada a partir de soluções estoque de OLZ mantidas por 6 h à temperatura ambiente (21–23°C) e após 5 dias a 4°C.

Em função da necessidade de injeções ou reinjeções de amostras extraídas e organizadas no autoinjetor após um longo tempo, a estabilidade no autoinjetor a 4°C foi avaliada no período de 8 horas.

Amostras não extraídas foram mantidas à temperatura ambiente (21–23°C) (curta duração) sobre a bancada de trabalho durante um tempo superior ao tempo máximo esperado para a preparação de amostras de rotina (6 h).

A estabilidade de longa duração em temperatura de armazenamento de -70 °C também foi estudada com amostras de CQB e CQA e foi monitorada durante a validação e durante o período de armazenamento das amostras do estudo de bioequivalência. O período total de armazenamento foi de 56 dias.

Para a avaliação da estabilidade frente a ciclos de congelamento e descongelamento amostras de CQB e CQA foram submetidas a três ciclos de gelo e degelo, cada ciclo consistiu em remover as amostras do freezer (-80 °C) e deixar em repouso por 3 h a temperatura ambiente e, após esse período, recongelar a -80 °C.

Todas as amostras descritas foram comparadas com concentrações nominais e amostras de OLZ recém-preparadas de mesma concentração, possibilitando expressar os resultados como porcentagem de degradação. A temperatura e duração dos testes foram escolhidas com base nas condições do laboratório analítico e desenho do estudo farmacocinético.

Segundo a resolução nº27 da ANVISA, a estabilidade é demonstrada quando não se observar EPR superior a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal. No entanto, em algumas literaturas não há um critério exato de aceitação dos estudos de estabilidade em solução, apenas se define que a estabilidade aceitável deve apresentar uma degradação mínima (CASSIANO et al., 2009).

6.2.4 Estudo clínico

6.2.4.1 Seleção dos participantes da pesquisa

O total de 28 participantes de pesquisa saudáveis, homens, de nacionalidade brasileira, com idade entre 18 e 45 anos foram incluídos no estudo com base no histórico médico, exames físicos, eletrocardiograma e exames laboratoriais (glicose sanguínea, uréia, creatinina, TGO, TGP, fosfatase alcalina, g-GT, bilirrubina total, albumina e proteínas totais, triglicérides, colesterol total, ácido úrico, hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de células brancas, exame de urina) realizados antes do início do estudo e na sua conclusão. E os critérios de inclusão e exclusão foram:

Critérios de inclusão

- ✓ Sexo masculino;
- ✓ Idade entre 18 e 45 anos;
- ✓ Peso acima de 70 kg;
- ✓ Relação peso altura dentro do peso ideal $\pm 10\%$;
- ✓ Pressão sanguínea sistólica entre 110 e 120 mmHg e diastólica entre 70 e 80 mmHg;
- ✓ Exames hematológicos dentro das especificações;
- ✓ Exames bioquímicos da função hepática e função renal dentro da normalidade;
- ✓ Eletrocardiograma e parecer de cardiologista, atestando normalidade;
- ✓ Exames de HIV e hepatites B e C negativos

Critérios de exclusão

- ✓ Valores anormais nos exames físicos, electrocardiograma ou laboratoriais;
- ✓ Uso abusivo de álcool e outras drogas;
- ✓ Fumante;
- ✓ Estar fazendo uso de medicamento;
- ✓ Histórico de doenças;
- ✓ Alergia ao fármaco ou história de alergia a medicamentos;
- ✓ Não atendimento aos critérios de inclusão.

Os participantes da pesquisa foram instruídos a abster-se de qualquer medicação, uma semana antes e durante o estudo. Todos os participantes da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de ética da Universidade Federal de Pernambuco (CAAE – 0224.0.172.000-09).

6.2.4.2 Desenho do estudo

O estudo foi aberto, randomizado, cruzado 2x2, com dose única oral de OLZ (10 mg) comprimido (Cristália, SP, Brasil) (produto teste) e comprimido revestido ZYPREXA® (Eli Lilly, IN, USA) (produto referência) para avaliar a biodisponibilidade relativa oral dos produtos. Os participantes da pesquisa foram internados por um período de 36 h e distribuídos em grupos A e B. Durante o primeiro período do estudo, o grupo A recebeu a dose única (10mg) do produto referência, enquanto o grupo B recebeu a dose única do produto teste, de acordo com o cronograma de randomização. No segundo período do estudo, a ordem dos grupos foi invertida.

Considerando $t_{1/2}$ máximo encontrado na literatura (GOODMAN; GILMAN, 2004) de 44,4 h, utilizou-se um período de *washout* de 21 dias (504 h), que corresponde a 11,35 vezes a $t_{1/2}$ do fármaco. Este tempo de *washout* é superior ao recomendado na Resolução RE nº 1170, de 19 de abril de 2006.

As doses foram administradas pela manhã com 300 mL de água após 10h de período de jejum. Nenhuma alimentação foi permitida durante 3h e 15 min após ingestão da dose. Os participantes da pesquisa receberam alimentação padronizada: almoço, lanche e jantar 3 h e 15 min, 8 h e 12 h, respectivamente, após administração da dose de cada grupo. Os participantes da pesquisa não ingeriram álcool ou comida e bebida contendo cafeína ou xantina durante o estudo. A dieta dos participantes da pesquisa foi estabelecida com supervisão de uma nutricionista e definida de modo a não interferir com a análise e a farmacocinética do medicamento estudado, como estabelecido no protocolo do estudo. A dieta obedeceu a um padrão único para os dois períodos do estudo.

O cronograma de coleta deve garantir a caracterização do perfil farmacocinético do fármaco, sendo necessário assegurar uma eficiente determinação da $C_{máx}$ através das coletas de amostras que estejam próximas à região do intervalo de tempo previsto para a ocorrência do $T_{máx}$. E a ANVISA determina que a coleta das amostras conte em um tempo igual ou superior a 3-5 vezes a meia-vida de eliminação do fármaco ou do metabólito, portanto deve

haver coletas de amostras na fase de eliminação, o que diz respeito aos últimos pontos de coleta.

O fármaco que apresenta meia-vida de eliminação superior a 24 horas pode ter cronograma de coleta de amostras de até 72 horas, para obtenção dos parâmetros farmacocinéticos de $C_{máx}$ e ASC , que são objetivos do estudo de bioequivalência e ainda permite que o número de coleta de amostras dos participantes da pesquisa seja menor.

Amostras de sangue venoso (8 mL) foram coletadas antes da administração da dose e 0,5; 1; 2; 3; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 9; 10; 12; 18; 24; 48 e 72 h após a dose através de cateter heparinizado introduzido em veia superficial do antebraço do voluntário. Depois de cada coleta de sangue, o cateter foi heparinizado com 1 mL de solução heparina sódica 50 UI/mL em soro fisiológico estéril 500 mL (Blausiegel Ind. E Com. Ltda., Cotia, Brasil). Em seguida, as amostras foram imediatamente transferidas para tubos contendo EDTA (ZheJiang GongDong Medical Technology Company, Ltd., Taizhou, Zhejiang, China) submetidas à centrifugação a 3000 RPM por 5 min para obtenção das amostras de plasma, que foram estocadas em tubo criogênico de polipropileno a -80°C até análise.

6.2.4.3 Farmacocinética e análises estatísticas

Os parâmetros farmacocinéticos da OLZ determinados para os produtos teste e referência foram: $C_{máx}$, $T_{máx}$, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$, $t_{1/2}$ e K_{el} calculados por análise nãocompartmental usando *software* WinNonlin® versão 5.2.1 (Pharsight Corporation, Sunnyvale, CA, USA).

$C_{máx}$ e $T_{máx}$ foram obtidos diretamente da curva concentração x tempo. A ASC_{0-t} foi estimada por integração, utilizando a regra dos trapezoides, a partir do tempo zero até a última concentração medida no tempo t . K_{el} foi calculada aplicando a análise de regressão log-linear para, pelo menos, as três últimas concentrações mensuráveis de OLZ. A $t_{1/2}$ foi calculada como $0,693/K_{el}$ e $ASC_{0-\infty}$ foi calculada como $ASC_{0-t} + Ct/K_{el}$, onde Ct é a última concentração de OLZ mensurável.

ANOVA foi realizada transformando, logaritmicamente, os valores dos parâmetros farmacocinéticos ($C_{máx}$, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$). O modelo ANOVA incluiu a sequência, formulação e período como efeitos fixos, enquanto os sujeitos dispostos em sequencia foram modelados como efeito aleatório. Estes efeitos foram testados com nível de 5% de significância (CHOW; LIU, 2001).

A bioequivalência entre os produtos foi determinada através do cálculo dos intervalos de confiança (IC) 90% para a razão dos valores de $C_{máx}$ e ASC_{0-t} dos produtos teste e referência, usando dados transformados logaritmicamente. Os produtos seriam considerados bioequivalentes se o IC 90% para $C_{máx}$ e ASC_{0-t} estivesse entre 80-125%, como previamente definido pelo FDA e pela ANVISA. (BRASIL, 2006; FDA, 2001b; EMEA, 2010).

6.2.4.4 Tolerabilidade

A tolerabilidade foi avaliada através de monitoramento dos sinais clínicos vitais (pressão sanguínea usando esfingomanômetro e batimentos cardíacos) no momento da admissão no hospital, antes e 3, 7,5, 10, 18, 24, 48 e 72 h após da administração do medicamento. Os participantes da pesquisa foram entrevistados a cada tempo de coleta da amostra e a cada refeição e os eventos adversos, espontaneamente relatados, ao longo do estudo, foram registrados.

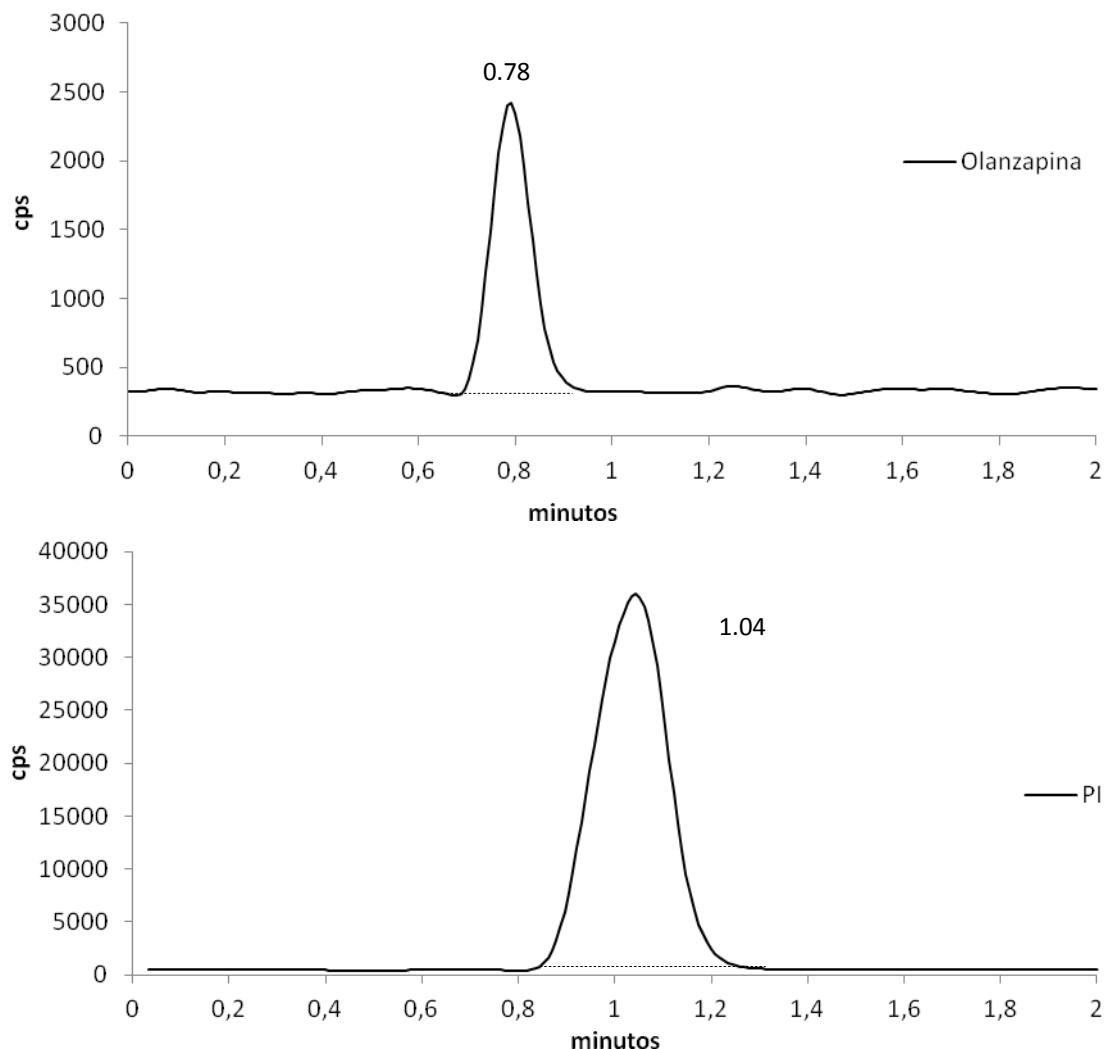
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Método de quantificação da olanzapina em plasma humano

6.3.1.1 Condições operacionais do método CL-EM/EM

As condições cromatográficas encontradas foram coluna ACE C18 125 × 4,6 mm, 5 μm (ACE, Aberdeen, Scotland, UK) com pré-coluna Gemini C18 2 × 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Volumes das amostras de 10 μL foram injetados, acompanhado de 0,8 mL de solução de lavagem da agulha consistindo em 0,5% ácido fórmico em acetonitrila:2-propanol:água (45:10:45, v/v/v) para evitar o fenômeno de *carry-over*. A fase móvel consistiu de água com 0,1% ácido fórmico como solvente A e acetonitrila com 0,1% ácido fórmico como solvente B (50:50 v/v), em modo isocrático. A taxa de fluxo de 1,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ foi utilizada, com *split* de 9 volumes descartados e 1 volume para espectrômetro de massas (0,12 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$). O forno foi mantido à temperatura ambiente (21–23°C). Os tempos de retenção para OLZ e PI foram 0,78 e 1,04 min, respectivamente, sendo a corrida analítica de 2 min (Figura 33).

Figura 33 - Cromatograma ilustrando a análise da OLZ e do P.I. extraídos do plasma

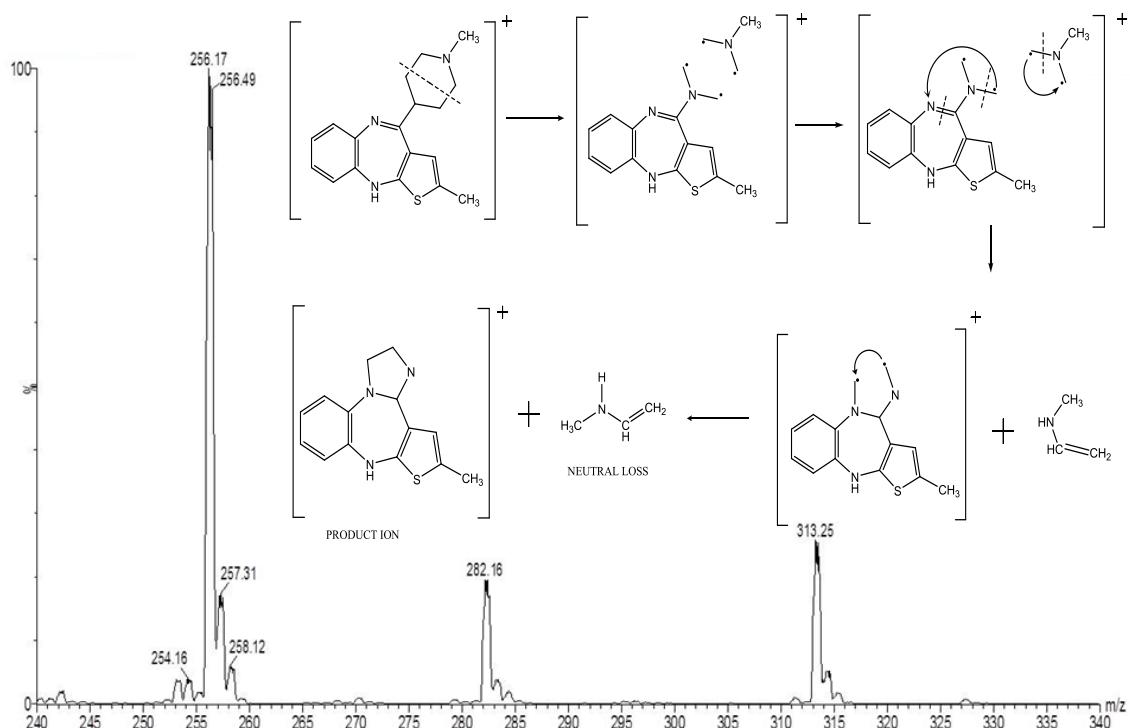


Os parâmetros do espectrômetro de massas foram otimizados a fim de obter um sinal máximo sem fragmentação na fonte de ionização e um MRM com mais sensibilidade e fragmento estável para obter uma alta relação sinal/ruído. A temperatura da fonte foi otimizada a 115°C, a temperatura de desolvatação foi 250°C e fluxo do gás de desolvatação foi 400L·h⁻¹. A voltagem do capilar foi fixada em 0,5 kV, enquanto que a voltagem do cone para OLZ e PI, foram 35 V e 10 V, respectivamente. A energia de colisão otimizada para OLZ e PI foi 30 V para ambas, usando argônio como gás na pressão de 1.88×10^{-3} psi na célula de colisão com multiplicador fixado em 700 V para a detecção.

Os experimentos de infusão para otimização de monitoramento de reações múltiplas (MRM) e estudos de supressão iônica foram realizados com Bomba Harvard Apparatus 11 elite syringe (Hollston, MA, USA) no fluxo de 30 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. O método MRM foi preparado

incluindo a transição de massa mais intensa para OLZ e PI. A Figura 34 mostra o espectro de massa com ionização eletrospray positivo da OLZ com o íon precursor e o íon produto (m/z 313,1 $>$ 256,1) e a transição de massa, monitorada em modo MRM. O espectro também mostrou outro fragmento de OLZ (m/z 282,1), mas sua intensidade foi menor que a do fragmento selecionado (m/z 256,1). Após realização do *scan* completo, nenhum fragmento foi observado na fonte de ionização.

Figura 34 - Íon produto ESI + da olanzapina (A), obtido utilizando o espectrômetro Triplo Quadrupolo.



Bogusz et al., 1999 descreveu um método de ionização química à pressão atmosférica (APCI)-MS/MS com LIQ de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Kratzsch et al., 2006 descreveu um método APCI-MS com LIQ de $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. A comparação entre os métodos APCI e ESI mostrou que ESI produziu o sinal mais intenso. Em adição, a ionização do método aqui descrito foi operada em modo positivo, visto que ambos OLZ e PI são compostos básicos com valores de pKa de 7,24 e 8,91, respectivamente (FDA, 2009).

Inúmeros métodos bioanalíticos com um baixo LIQ estão descritos para análises de matrizes biológicas: plasma humano (BONDE et al., 2014; GOPINATH et al., 2012; KRATZSCH et al., 2003; KOLLROSER et al., 2002; NIROGI et al., 2006; PATEL et al.,

2012; ZHOU et al., 2004), soro humano (BOGUSZ et al., 1999; CHIN et al., 2004; JOSEFSSON et al., 2010), sangue (BERNA et al., 2002; NIELSEN; JOHANSEN, 2009) fluido cerebroespinhal (JOSEFSSON et al., 2010) e urina (URDIGERE; BESAGARAHALLY; BASAVAIAH, 2012) por CL-EM/EM.

O mais sensível dos métodos descritos mostra um LIQ de $0,05 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ com uma longa técnica de preparo de amostra utilizando extração em fase sólida (EFS), possuindo nove etapas e utiliza o equipamento API 3000 (MDS SCIEX, Foster City, CA, USA). Outro método com baixo LIQ ($0,1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), com o preparo de amostra através de ELL está descrito, no entanto, apresenta o uso de solvente orgânico em alta quantidade (4 mL de dietil éter : diclorometano (7:3, v/v)) e equipamento API 4000 (MDS SCIEX, Foster City, CA, USA) (NIROGI et al., 2006).

Josefsson et al., 2010 descreveu um método, que usa também um alto volume de solvente orgânico (2 mL de MTBE) e equipamento API 4000 (MDS SCIEX, Foster City, CA, USA), tendo um LIQ de $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $0,2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ para plasma humano e fluido cerebroespinhal, respectivamente. Para o método atual desenvolvido, a utilização de solvente orgânico foi em menor quantidade (1,5 mL de MTBE) e o espectrômetro de massas Quattro LC system da Waters Corporation (Milford, MA, USA) pertence a uma antiga geração e ainda com o LIQ de $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, tem sido suficiente para o cálculo da ASC_{0-72h} .

Entre os métodos descritos acima, apenas três possuem a corrida analítica de 2 min, entre eles: Patel et al., 2012 e Bonde et al., 2014 utilizando EFS e API-4000 (MDS SCIEX, Toronto, Canada) e o corrente método. Assim o corrente método desenvolvido mostrou baixo LIQ ($1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) associado a uma rápida corrida analítica (2 min) com ELL e equipamento Quattro LC (Waters Corporation, Milford, MA, USA), representando o principal diferencial em relação aos métodos publicados na literatura que utilizam CL-EM/EM. Portanto, pode-se levar em consideração que, mesmo alguns equipamentos considerados antigos, fornecem resultados satisfatórios.

O método analítico descrito inclui uma ELL com MTBE, resultando em material extraído com grau de pureza suficiente para ser injetada no sistema cromatográfico. Este procedimento de extração, aliada à separação muito eficiente oferecida pelo sistema CLAE e a elevada seletividade do espectrômetro de massas no modo MRM com fonte de ionização *electrospray* (CLAE-ES+/EM/EM) possibilitou um processo de quantificação muito sensível e reproduzível.

6.3.1.2 Preparo das amostras

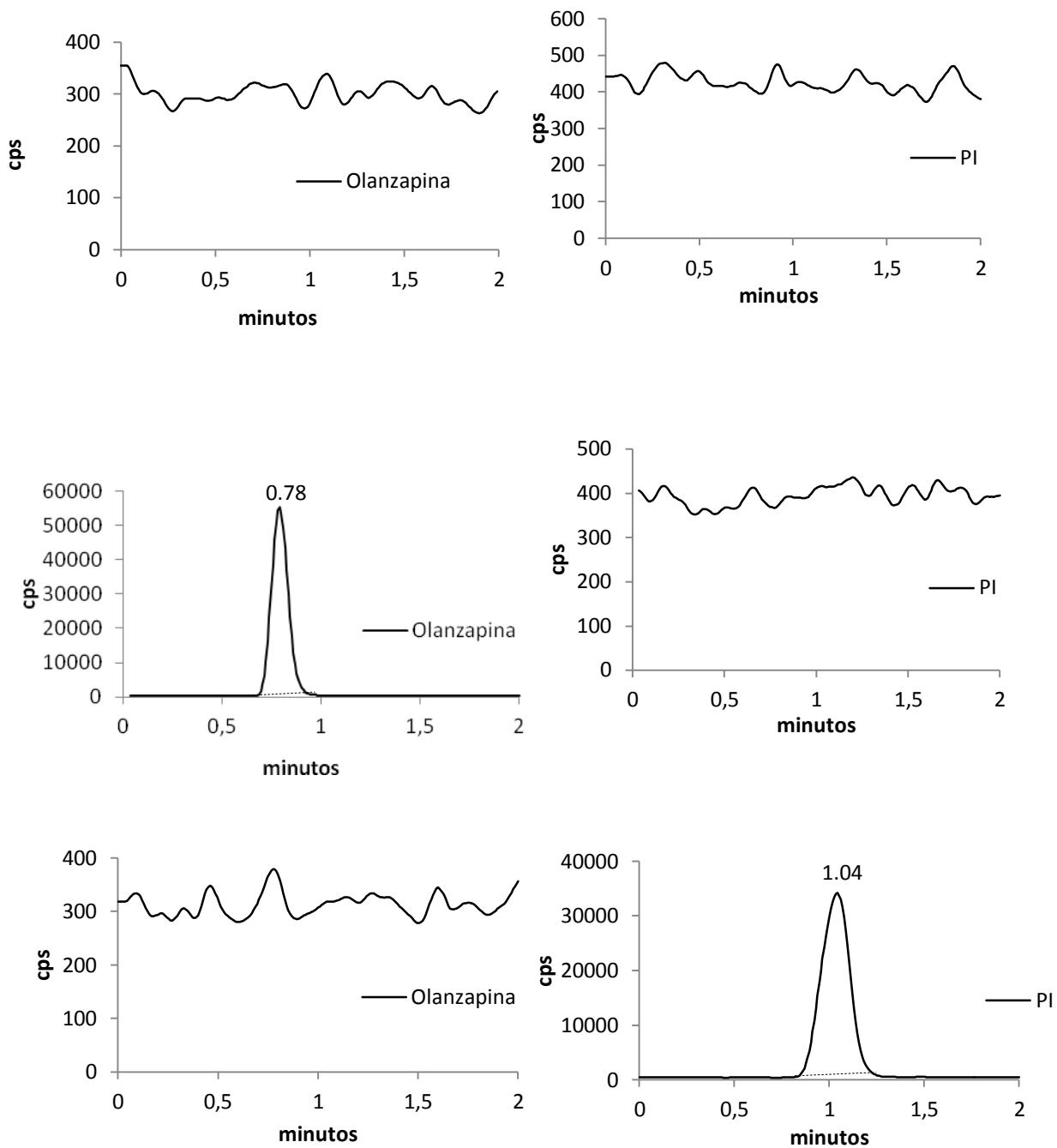
Amostra de plasma (400 μ L) foi transferida para um tubo de polipropileno de 2 mL com PI (50 μ L, 1000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) e submetido à agitação no vortex por 30seg. Foram adicionados 1,5 mL de MTBE e a solução foi submetida à agitação novamente por 1 min. As amostras foram centrifugadas a 3000 RPM por 5 min. A fase aquosa foi, então, descartada e a fase orgânica foi transferida para um tubo de polipropileno. O solvente foi evaporado através de secagem a 40°C sob fluxo de N₂ e o resíduo foi redissolvido em 250 μ L de água:acetonitrila (1:1 v/v). Em seguida, 200 μ L foram transferidos para um *vial* de 250 μ L e colocado no autoinjetor para análise.

6.3.2 Método de validação

6.3.2.1 Seletividade

O método aplicado demonstrou excelente seletividade sem interferentes endógenos ou metabólicos nos tempos de retenção da OLZ e do PI (Figura 4.3), mesmo com baixa retenção cromatográfica e corrida analítica de 2 min. O teste de *cross talk* mostrou nenhuma interferência entre os canais MRM da OLZ e PI apesar de baixa resolução cromatográfica entre os compostos analisados. E o teste de *carry over* também mostrou nenhuma interferência entre as amostras provenientes da injeção de uma primeira amostra nas injeções subsequentes, configurando a inexistência de contaminação por *carry over*.

Figura 35 - Íon produto ESI + da olanzapina (A), obtido utilizando o espectrômetro Triplo Quadrupolo Cromatogramas de plasma branco (A), plasma branco fortificado com $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ padrão de OLZ (B) e plasma branco fortificado com $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ do PI. (C).



6.3.2.2 Efeito matriz, recuperação e eficiência de processo

A OLZ apresentou as recuperações ($n = 6$) para CQB, CQM e CQA como se segue em plasma normal: $97,10 \pm 13,57\%$, $90,35 \pm 6,07\%$ e $82,80 \pm 10,42\%$, respectivamente. A recuperação do PI foi de $101 \pm 3,45\%$. O EM e EP foram $93,29\%$, e $88,78\%$, respectivamente e foram consistentes ao longo dos intervalos das concentrações dos analitos analisados. De acordo com a avaliação da RE e com as amostras pós-extração fortificadas, os resultados do EM mostraram nenhuma influência significante da matriz biológica na resposta analítica da OLZ. Então, não houve supressão significativa de íons na região em que o analito e o padrão interno foram eluídos.

6.3.2.3 Linearidade

A análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ponderada (weighted *Linear least-square regression analysis*) foi efetuada para obter a linearidade com mais de uma ordem de grandeza, por exemplo: $1 - 20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($1/x$), com média de coeficiente de determinação de 0,9976 ($n = 3$ corridas analíticas, Tabela 14) e exatidão dos resultados entre 92,61 -106,64%. O LIQ foi $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. Este método foi, portanto, confiável e de qualidade como mostrado pela exatidão dos padrões de calibração.

Tabela 14 - Exatidão e precisão da linearidade do método de validação.

Concentração teórica ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Concentração determinada ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) (Média \pm DP) ($n = 3$)	Precisão (DPR%)	Exatidão (ER%)
1	$0,927 \pm 0,060$	6,50	-7,39
1,5	$1,600 \pm 0,098$	6,16	6,64
3	$2,923 \pm 0,166$	5,68	-2,57
6	$5,865 \pm 0,099$	1,69	-2,25
10	$9,348 \pm 0,647$	6,93	-6,52
13	$12,183 \pm 0,991$	7,48	-6,28
16	$16,529 \pm 2,037$	12,33	3,31
20	$20,213 \pm 0,902$	4,46	1,07

Os cromatogramas do plasma humano extraído contendo a baixa concentração de OLZ ($1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) e PI indicaram uma boa resposta detectada para ambos compostos. A

relação sinal/ruído foi 76,6 para o pico do LIQ e 800,0 para o PI. Indicando que os picos cromatográficos estão bem maiores que o ruído médio do equipamento.

6.3.2.4 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão intra e interdia do LIQ, CQB, CQM e CQA permitiu resultados satisfatórios que variaram de DPR <14,60%, ER <9,04% (intra) e DPR <11,60%, e EPR <1,66%, (inter) (Tabela 15). Os dados obtidos para OLZ estão de acordo com os limites aceitáveis estabelecido nos guias para validação de métodos bioanalíticos (FDA, 2001).

As principais vantagens deste método são simples preparo de amostra, curta corrida analítica (2 min), robustez para análise em alta demanda (1.176 amostras foram analisadas) e boa sensibilidade (avaliação *in vivo* de 10 mg de OLZ em comprimido), sendo todas importantes características quando se trata de alto número de amostras provenientes de estudos farmacocinéticos.

Tabela 15 - Resultados de precisão e exatidão do método de validação

Conc. teórica (ng·mL ⁻¹)	Intradia (ng·mL ⁻¹) (n = 5)			Interdia (ng·mL ⁻¹) (n = 15)		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Média	Precisão (DPR%)	Exatidão (ER%)
	Média (DPR)	Média (DPR)	Média (DPR)			
1	1,03 (5,1%)	0,99 (14,6%)	0,94 (8,6%)	0,99	11,60	-1,44
3	2,96 (1,5%)	3,15 (5,5%)	2,76 (3,1%)	2,96	6,62	-1,48
9	8,34 (2,6%)	9,35 (3,5%)	9,12 (1,1%)	8,94	5,62	-0,70
18	16,37 (2,6%)	18,62 (2,5%)	18,11(6,4%)	17,70	6,88	-1,66

6.3.2.5 Estudos de estabilidade

A concentração da OLZ foi comparada com aquela obtida a partir de amostras preparadas imediatamente antes do ensaio, possibilitando expressar os resultados como percentagem de degradação. Os dados de estabilidade da OLZ em plasma sobre diferentes condições de temperatura, tempo e ciclos de gelo-degelho demonstraram que as concentrações calculadas para os controles não apresentaram degradação significativa ao longo do estudo e mostraram condições apropriadas para o estudo farmacocinético.

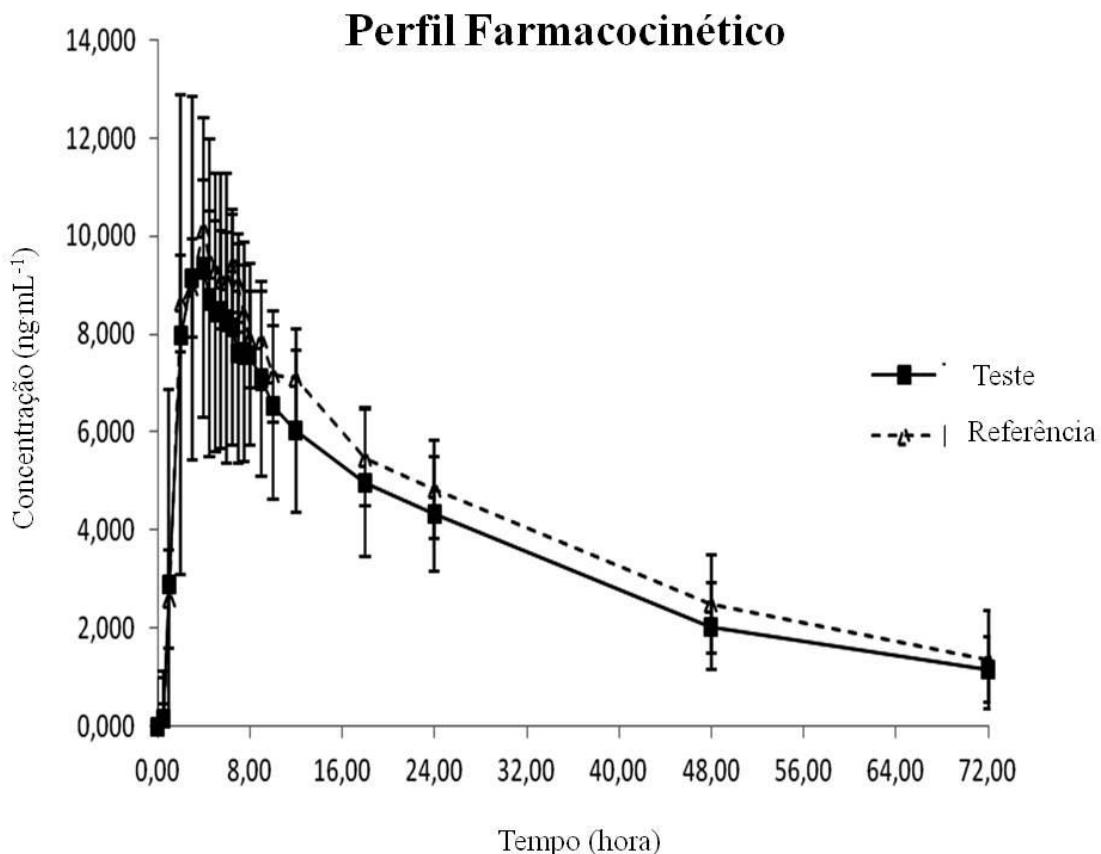
A estabilidade da solução estoque foi por 6 h a temperatura ambiente e por 5 dias sob condições refrigeradas (4°C). As amostras de CQ em plasma humano foram estáveis por, no mínimo, 8 h no autoinjetor (4°C) (estabilidade pós-processamento), por, no mínimo, 6 h a temperatura ambiente (estabilidade curta duração), no mínimo, 56 dias quando estocadas a -80°C (estabilidade de longa duração) e para, o mínimo de, três ciclos gelo-degelo.

6.3.3 Aplicação do Método – Estudo Farmacocinético

O método descrito neste trabalho apresentou um excelente desempenho durante a validação para a determinação de olanzapina em plasma humano, está em conformidade com os requisitos da ANVISA e FDA para a quantificação de drogas em estudos farmacocinéticos em humanos e foi aplicado com sucesso para um estudo farmacocinético em que a concentração de OLZ foi avaliada em amostras de plasma de 28 participantes da pesquisa saudáveis após dose única oral de 10 mg de OLZ em comprimido.

O perfil da concentração média x tempo está mostrado na Figura 36. Os valores médios dos parâmetros farmacocinéticos $C_{\text{máx}}$, $T_{\text{máx}}$, ASC_{0-T} , $ASC_{0-\infty}$ estão mostrados na Tabela 4.4. Estes resultados estão de acordo com dados anteriormente publicados (BONDE et al., 2014; PATEL et al., 2012). Os valores de $t_{1/2}$ para os medicamentos referência e teste foram $25,28 \pm 6,5$ h, $45,53 \pm 106,33$ h, respectivamente. E a K_{el} foi de 0,0029 para ambos. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os parâmetros farmacocinéticos das formulações teste e referência e o IC de $C_{\text{máx}}$ foi 83,15–99,2 e da ASC_{0-t} foi 80,07–92,51. Portanto, sendo considerados bioequivalentes.

Figura 36 - Perfil da concentração plasmática x tempo de 28 participantes da pesquisa saudáveis após a administração de dose única oral de 10 mg de olanzapina (produto teste versus referência).



Uma comparação dos parâmetros farmacocinéticos já reportados na literatura foi realizada (CAO et al., 2012; CHATSIRICHAROENKUL et al., 2011; CHEN et al., 2012; ELSHAFEEY; ELSHERBINY; FATHALLAH, 2009; ZAKERI-MILANI et al., 2013). A tabela 16 mostra os resultados de $C_{\text{máx}}$, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ de estudos com participantes da pesquisa de diferentes etnias (chineses, tailandeses, iranianos e egípcios) que foram todos realizados com participantes da pesquisa saudáveis do sexo masculino (exceto para o estudo com tailandeses, que incluíam 12 homens e 12 mulheres). Os estudos foram aberto, randomizado, cruzado 2×2 e realizado em condições de jejum e as concentrações plasmáticas foram determinadas após a administração de 10 mg OLZ comprimido.

Tabela 16 - Parâmetros farmacocinéticos e análise estatística dos produtos teste e referência no corrente estudo e outros métodos publicados

Grupo étnico, número de participantes da pesquisa, Sexo, Dose farmacêutica, Tempo de coleta das amostras	C _{máx} (ng·mL ⁻¹)		T _{máx} (h)		ASC _{0-t} (ng/mL·h ⁻¹)		ASC _{0-∞} (ng/mL·h ⁻¹)		Referência
	Ref.	Teste	Ref.	Teste	Ref.	Teste	Ref.	Teste	
Brasileiro, 28, M, 10 mg comprimido, 72 h	12,50±3,73	11,47±3,65	4,30±2,37	4,50±1,85	283,12 ± 94,84	240,97 ± 78,46	345,21 ± 110,03	375,88 ± 383,65	BEDOR et al., 2015
Chinês, 24, M, 10 mg comprimido, 144 h	18,44±4,758	18,91±5,20	ND	ND	587,3± 127,12	582,9± 118	615,8± 137,45	615,4± 131,39	CHEN et al., 2012
Chinês, 20, M, 10 mg comprimido, 144 h	22,44±5,20	21,05±5,81	3,20±0,60	3,20±0,80	607,43±141,07	630,19±177,73	649,39±132,01	673,33±174,74	CAO et al., 2012.
Tailandês, 24, M/F, 10 mg comprimido, 120 h	26,4 ± 8,45	27,60 ± 8,45	3,00 (1,00-4,50)	3,53 (1,00-6,00)	805 ± 313	835 ± 355	863 ± 366	901 ± 408	CHATSIRICHARO ENKUL et al., 2011
Iraniano, 24, M, 10 mg comprimido, 72 h	15,72±4,25	15,82± 19,91	6,25± 1,22	5,07± 25,.31	440,37 ± 98,75	447,19± 100,64	558,66± 129,57	570,75± 130,55	ZAKERI-MILANI et al., 2013. ELSHAFEEY; ELSHERBINY; FA THALLAH, 2009;
Egípcio, 24, M, 10 mg comprimido, 72 h	11,60 ± 4,08	13,07 ± 4,47	6,42±4,04	6,04 ±2,77	367,26 ± 119,22	363,38± 129,68	477,98± 137,38	466,87±165,.38	

Desenho dos estudos descritos na tabela: aberto, randomizado, cruzado 2×2, condições de jejum. A droga referência utilizada em todos os estudos foi Zyprexa®. ND: não descrito.

Uma influência da etnia na taxa e extensão da biodisponibilidade foi encontrada utilizando análise estatística por avaliação não paramétrica com o teste de Games-Howell. Os dois estudos chineses e o estudo tailandês mostraram $C_{máx}$ mais alto que os reportados por outros estudos. Isto pode indicar uma significativa diferença no metabolismo da OLZ entre asiáticos (chineses e tailandeses) e outros grupos étnicos (brasileiros, iranianos e egípcios), que pode ser devido a fatores farmacogenéticos.

O metabolismo da OLZ ocorre no fígado pelas isoformas *CYP1A2* e *CYP2D6* do citocromo P450. Os diferentes valores dos parâmetros farmacocinéticos dos diferentes grupos étnicos poderiam ser explicados através do processo metabólico da OLZ, de acordo com o processo oxidativo mediado pela citocromo P450 isoenzima *CYP1A2* e em menor grau, pela *CYP2D6* (RAO, 2001). A presença de alelos defeituosos *CYP2D6*10* em asiáticos (chineses e tailandeses), que pode estar presente em mais de 50% da população asiática, é responsável pela reduzida atividade enzimática observada nos metabólitos intermediários (BERNARD et al., 2006).

Ainda, uma influência de polimorfismo no gene *CYP1A2* foi encontrada mostrando que a distribuição do haplótipo em coreanos, japoneses e chineses (asiáticos) é diferente de que nos africanos e europeus. Isto poderia contribuir para as diferenças no perfil farmacocinético entre as populações étnicas (WOO et al., 2009). O $C_{máx}$ determinado no corrente estudo está de acordo com estudos realizados em iranianos e egípcios anteriormente reportados (ELSHAFEEY; ELSHERBINY; FATHALLAH, 2009; ZAKERI-MILANI et al., 2013).

O alto valor de $C_{máx}$ encontrado em estudos asiáticos poderia explicar o alto número de efeitos adversos no estudo tailandês. Um total de 108 eventos adversos foi relatado (50 do produto teste e 58 do produto referência), todos foram suaves e nenhum evento sério foi observado (CHATSIRICHAROENKUL et al., 2011). Em contraste, no corrente estudo foram relatados 68 eventos adversos (33 do produto teste e 35 do produto referência). A ASC_{0-t} não foi avaliada porque diferentes tempos de coletas das amostras foram utilizados.

6.3.3.1 Tolerabilidade

Durante o primeiro período do estudo, 100% dos participantes da pesquisa relataram sonolência e 13,79% relataram náusea para as formulações teste e referência. Nenhuma anormalidade clínica relevante foi encontrada ao final do estudo.

6.4 CONCLUSÕES

Um simples e rápido método CL-EM/EM para quantificação de OLZ em plasma humano foi descrito, que mostrou precisão aceitável e adequada sensibilidade. Este método está de acordo com os requisitos propostos pela ANVISA e FDA de alta sensibilidade, especificidade e alto rendimento da amostra em ensaios comparativos farmacocinéticos tais como estudos de bioequivalência. O mesmo foi aplicado com êxito para um estudo clínico farmacocinético da OLZ (10 mg comprimido) em participantes da pesquisa saudáveis do sexo masculino. Além dos resultados da análise de comparação da farmacocinética estarem de acordo com outros estudos similares publicados.

6.5 REFERÊNCIAS

Aravagiri, M.; Ames, D.; Wirshing, W.C.; Marder, S.R. Plasma level monitoring of olanzapine in patients with schizophrenia: determination by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.19, n.3, p.307–313, 1997.

Bao, J.; Potts, B.D. Quantitative determination of olanzapine in rat brain tissue by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 752, p. 61–67, 2001.

Brasil. Resolução RE nº 1.170 de 19 de abril de 2006. “Guia para provas de biodisponibilidade relativa/ bioequivalência de medicamentos”. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, 24 de abril. 2006.

Brasil. Resolução RDC nº 27, de maio 17 de 2012. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos”. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, 22 de maio. 2012.

Beasley Jr, C.M.; Tollefson, G.; Tran, P.; Satterlee, W.; Sanger, T.; Hamilton, S; Olanzapine versus placebo and haloperidol: Acute phase results of the North American double-blind olanzapine trial. **Neuropsychopharmacology**, v.14, n.2, p.111–123, 1996.

Bergemann, N.; Frick, A.; Parzer, P.; Kipotz, J. Olanzapine plasma concentration, average daily dose, and interaction with co-medication in schizophrenic patients. **Pharmacopsychiatry**, v. 37, p. 63–68, 2004.

Berna, M.; Ackermann, B.; Ruterbories, K.; Glass, S. Determination of olanzapine in human blood by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 567, p.163–168, 2002.

Bernard, S.; Neville, K.A.; Nguyen, A.T.; Flockhart, D.A. Interethnic differences in genetic polymorphisms of *CYP2D6* in the US population: Clinical implications. **Oncologist**, v.11, n.2, p.126–135, 2006.

Bogusz, M.J.; Kruger, K.D.; Maier, R.D.; Erkwoh, R.; Tuchtenhagen, F. Monitoring of olanzapine in serum by liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 732, p.257–269, 1999.

Bonde, S.L.; Bhadane, R.P.; Gaikwad, A.; Gavali, S.R.; Katale, D.U.; Narendiran, A.S Simultaneous determination of olanzapine and fluoxetine in human plasma by LC–MS/MS: Its pharmacokinetic application. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 90, p. 64–71, 2014.

Boulton, D.W.; Markowitz, J.S.; Devane, C.L. A high-performance liquid chromatography assay with ultraviolet detection for olanzapine in human plasma and urine. **Journal Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 759, p. 319–323, 2001.

Cao, J.; Zhang, Z.; Tian, Y.; Li, Y.; Rui, J. Liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of olanzapine in human plasma and application to a bioequivalence study. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 8, p. 247–254, 2012.

Catlow, J.T.; Barton, R.D.; Clemens, M.; Gillespie, T.A.; Goodwin, M.; Swanson, S.P. Analysis of olanzapine in human plasma utilizing reversed phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 668, p. 85–90, 1995.

Chatsiricharoenkul, S.; Niyomnaitham, S.; Pongnarin, P.; Sathirakul, K.; Kongpatanakul, S. Bioequivalence study of 10 mg olanzapine tablets in healthy Thai volunteers. **Journal of Bioequivalence and Bioavailability**, v. 3, p. 82–85, 2011.

Chen, Q.; Zhang, M.Q.; Liu, Y.; Liu, Y.M.; Li, S.J.; Lu, C.; Liu, G.Y.; Qi, Y.L.; Yu, C.; Jia, J.Y. Pharmacokinetics and bioequivalence of 2 tablet formulations of olanzapine in healthy Chinese volunteers: A randomized, open-label, single-dose study. **Arzneimittelforschung**, v 62, p. 508–512, 2012.

Chin, C.; Zhang, Z.P.; Karnes, H.T. A study of matrix effects on an LC-MS/MS assay for olanzapine and desmethyl olanzapine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, p. 1149–1167, 2005.

Chow, S.C.; Liu, J.P. **Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies.** 2nd ed. New York, 2000.

Dusci, L.J.; Hackett, L.P.; Fellows, L.M.; Ilett, K.F. Determination of olanzapine in plasma by high-performance liquid chromatography using ultraviolet absorbance detection. **Journal Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.773, p.191–197, 2002.

Elshafeey, A.H.; Elsherbiny, M.A.; Fathallah, M.M. A single-dose, randomized, two-way crossover study comparing two olanzapine tablet products in healthy adult male volunteers under fasting conditions. **Clinical Therapeutics**, v.31, n.3, p.600–608, 2009.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on the Investigation of Bioequivalence. 2010. Disponível em: http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf (acesso em 2 de maio de 2013).

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. May 2001a. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf> (acesso em 22 de Dezembro de 2014).

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for Industry: Statistical Approaches to Establishing Bioequivalence. 2001b. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070244.pdf> (acesso em 2 de maio de 2013).

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Medication guide: Zyprexa® (olanzapine) tablet and Zyprexa® Zydis® (olanzapine). 2009. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DrugSafety/UCM134700.pdf> (acesso em 22 de dezembro de 2014).

Fulton, B.; Goa, K.L. Olanzapine: A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in the management of schizophrenia and related psychoses. **Drugs**, v. 53, p.281–298, 1997.

Gerlach, J; Peacock, L. New antipsychotics: The present status. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 10, p. 39–48, 1995.

Goodman & Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10^a Ed. Rio de Janeiro, 2003. 1647p.

Gopinath, S.; Kumar, R.S.; Alexander, S.; Danabal, P. Development of a rapid and sensitive SPE-LC-MS/MS method for the simultaneous estimation of fluoxetine and olanzapine in human plasma. **Biomedical Chromatography**, v.26, p. 1077–1082, 2012.

Josefsson, M.; Kronstrand, R.; Andersson, J.; Roman, M. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of olanzapine and N-desmethylolanzapine in human serum and cerebrospinal fluid. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 576–582, 2003.

Kasper, S.C.; Mattiuz, E.L.; Swanson, S.P.; Chiu, J.A.; Johnson, J.T.; Garner, C.O. Determination of olanzapine in human breast milk by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.726, p. 203–209, 1999.

Kratzsche, C.; Peters, F.T.; Kraemer, T.; Weber, A.A.; Maurer, H.H. Screening, library-assisted identification and validated quantification of fifteen neuroleptics and three of their metabolites in plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, p.283–295, 2003.

Kollroser, M.; Schober, C. Direct-injection high performance liquid chromatography ion trap mass spectrometry for the quantitative determination of olanzapine, clozapine and N-desmethylclozapine in human plasma. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.16, p. 1266–1272, 2002.

Llorca, P.M.; Coudore, F.; Corpelet, C.; Buyens, A.; Hoareau, M.; Eschalier, A. Integration of olanzapine determinations in a HPLC-diode array detection system for routine psychotropic drug monitoring. **Clinical Chemistry**, v. 47, n. 9, p. 1719–1721, 2001.

Matuszewski, B.K.; Constanzer, M.L.; Chavez-Eng, C.M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Analitical Chemistry**, v. 75, p. 3019–3030, 2003.

McCormack, P.L.; Wiseman, L.R. Olanzapine: A review of its use in the management of bipolar I disorder. **Drugs**, v. 64, p. 2709–2726, 2004.

Moreira, R. F. **Determinação do perfil farmacocinético de medicamentos contendo fármacos de ação central aplicados à clínica**. Campinas: FCM -UNICAMP, 2014. 144p.

Nielsen, M.K.K, Johansen, S.S. Determination of olanzapine in whole blood using simple protein precipitation and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 33, p. 212–217, 2009.

Nirogi, R.V.S.; Kandikere, V.N.; Shukla, M.; Mudigonda, K.; Maurya, S.; Boosi, R.; Yerramilli, A. Development and validation of a sensitive liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry assay for the quantification of olanzapine in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 935–942, 2006.

Olesen, O.V.; Poulsen, B.; Linnet, K. Fully automated on-line determination of olanzapine in serum for routine therapeutic drug monitoring. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 23, p. 51–55, 2001.

Patel, D.S.; NSharma, N.; Patel, M.C.; Patel, N.B.; Shrivastav, P.S.; Sanyal, M. LC–MS/MS assay for olanzapine in human plasma and its application to a bioequivalence study. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 2, n. 5, p. 481–494, 2012.

Raggi, M.A.; Casamenti, G.; Mandrioli, R.; Volterra, V. A sensitive high-performance liquid chromatographic method using electrochemical detection for the analysis of olanzapine and desmethylolanzapine in plasma of schizophrenic patients using a new solid-phase extraction procedure. **Journal Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 750, p. 137–146, 2001.

Rao, M.L. Olanzapine: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring. **Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie**, v.69, p. 510–517, 2001.

Stahl, S.M. **Psychopharmacology of Antipsychotics**, 1stEd. London, 1999.

Titier, K.; Bouchet, B.; Pehourcq, F.; Moore, N.; Molimard, M. High-performance liquid chromatographic method with diode array detection to identify and quantify atypical antipsychotics and haloperidol in plasma after overdose. **Journal Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 788, p. 179–185, 2003.

Urdigere, A.K.R.; Besagarahally, B.L.; Basavaiah, K. Sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of olanzapine in human urine. **Arabian Journal for Science Engineering**, v. 37, p. 1381–1387, 2012.

Woo, S.W.; Kang, T.S.; Park, H.J.; Lee, J.E.; Roh, J. Comparison of linkage disequilibrium patterns and haplotype structure of eight single nucleotide polymorphisms across the CYP1A2 gene between the Korean, and other populations registered in the International HapMap database. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 34, p. 429–436, 2009.

Xu, R.N.; Lan, F.; Rieser, M.J.; El-Shourbagy, T.A. Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC–MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 342–355, 2007.

Zakeri-Milani, P.; Islambulchilar, Z.; Ghanbarzadeh, S.; Valizadeh, H. Single dose bioequivalence study of two brands of olanzapine 10 mg tablets in Iranian healthy volunteers. **Drug Research**, v. 63, p. 346–350, 2013.

Zhou, Z.; Li, X.; Li, K.; Xie, Z.; Cheng, Z.; Peng, W.; Wang, F.; Zhu, R.; Li, H. Simultaneous determination of clozapine, olanzapine, risperidone and quetiapine in plasma by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 802, p. 257–262, 2004.

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O método desenvolvido e validado para quantificação das amostras de olanzapina dos experimentos de recuperação apresentou uma vantagem, pois as amostras não necessitaram de tratamento prévio antes da injeção no CL-EM/EM, diferentemente do apresentado na literatura. Apenas uma simples diluição foi realizada para obter um volume de injeção suficiente. Portanto, o método foi considerado simples, rápido e fácil de reproduzir.

As sondas de microdiálise confeccionadas em laboratório foram consideradas semelhantes às comerciais com relação à eficiência de recuperação *in vitro*. Sendo, portanto, um artifício para redução de custos nos laboratórios de pesquisa que utilizem a técnica da microdiálise, visto que as sondas podem ser produzidas com materiais de fácil acesso e baixo custo, o que viabiliza a pesquisa na área de microdiálise, principalmente dentro das Universidades.

Este trabalho proporcionou a formação técnica em cirurgia estereotáxica no cérebro de ratos, bem como a caracterização da cinética de decaimento plasmático da olanzapina e modelagem farmacocinética com modelo bicompartimental e parâmetros farmacocinéticos que corroboram com dados já publicados na literatura.

O método desenvolvido e validado para quantificação da OLZ por CL-EM/EM foi simples, rápido, preciso e com alta sensibilidade aceitável e adequada para aplicação em um estudo farmacocinético. O método de preparo da amostra foi simples e com tempo de corrida curto, importante característica para validação de grande número de amostras, tais como estudos de bioequivalência. O estudo clínico farmacocinético aqui realizado mostrou formulação de olanzapina (teste) e a formulação referência Zyprexa® são consideradas bioequivalentes. Além dos parâmetros farmacocinéticos da olanzapina estarem de acordo com outros estudos similares publicados.

As perspectivas dessa tese são: Quantificação da dopamina nas amostras da microdiálise cerebral em ratos por CL-EM/EM; realizar a farmacocinética plasmática e a microdiálise cerebral em um número maior de animais e utilizando sonda confeccionada em laboratório; modelagem matemática *PKPD* para avaliação das diferentes concentrações da olanzapina versus seu efeito terapêutico; publicação de artigo sobre a relação farmacocinética plasmática e a microdiálise cerebral.

REFERÊNCIAS

- Aggarwal, D.; Pal, D.; Mitra, A. K.; Kaur, I.P. Study of the extent of ocular absorption of acetazolamide from a developed niosomal formulation, by microdialysis sampling of aqueous humor. **International Journal of Pharmaceutics**, v.38, p.21–26, 2007.
- Araújo, B.V. **Modelagem Farmacocinética-Farmacodinâmica do Antifúngico Voriconazol.** Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008a. 211p.
- Araújo, B.V.; Silva, C.F.; Haas, S.E.; Dalla Costa, T. Microdialysis as a tool to determine free kidney levels of voriconazole in rodents: a model to study the technique feasibility for a moderately lipophilic drug. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v.47, n.4-5, p.876-881, 2008b.
- Araújo, B.V. Validation of an efficient LC-microdialysis method for gemifloxacin quantitation in lung, kidney and liver of rats. **Journal of Chromatography B**, v.919-920, p. 62– 66, 2013.
- Arji, M. **Efectos de la administración crónica de risperidona en um modelo de esquizofrenia en rata.** Tese de doutorado. Faculdade de Medicina, Universidade de Salamanca. 2010. 262p.
- Barcelos, M. **A administração crônica de olanzapina altera parâmetros bioquímicos e metabólicos em ratos.** Dissertação de mestrado. União de Ensino Superior de Campina Grande. 2009. 76p.
- Bastos, J.C.S.; Cunha, L.C.; Ostrosky, E.A. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação do 4-nerolidilcatecol (4-NRC) em solução de proteína plasmática para aplicação em estudos de microdiálise cutânea. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.34, n.2, p:191-198, 2013.
- Bedor, D.C.G. The new context of interchangeability of medicine drugs in Brazil: Similar medicine drug and scientific approach. **Boletim Informativo Geum**, v.5, n. 2, p. 7-13, 2014.
- Behenck, A.; Silva, A.D.; Humerez, D.C.; Mancia, J.R.; Padilha, MICS. A família frente ao processo de tratamento e reinternação do portador de esquizofrenia. **Enfermagem em Foco**, v.2, n.210-214, 2011.
- Bleuler E. Dementia praecox or the group of schizophrenias. Monograph series on schizophrenia. Vol 1. New York, 1950.
- Brasil. Empresa https://www.lilly.com.br/Inserts/Patients/Bula_Zyprexa_Zydis_Paciente_CDS24SET12.pdf. Acessado em fevereiro de 2014.
- Eli Lilly.

Brasil. Ministério da Saúde. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/noticias-anteriores-agencia-saude/3464-parcerias-publico-privadas-viabilizam-producao-nacional-de-24-farmacos>. Acessado em dezembro de 2015.

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução - RE nº 894, de 29 de maio de 2003a.

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução - RE nº 898, de 29 de maio de 2003b.

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução - RE nº 1.170, DE 19 DE ABRIL DE 2006.

Brasil. Ministério da Saúde. PORTARIA Nº 978, DE 16 DE MAIO DE 2008.

Brasil. Ministério da Saúde. PORTARIA Nº 2.981, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2009.

Brasil. Ministério da Saúde. PORTARIA Nº 1.091, DE 28 DE MAIO DE 2012a.

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução - RE nº 27, de 17 de maio de 2012b.

Brasil. Ministério da Saúde. PORTARIA Nº 1554 DE 30 DE JULHO DE 2013.

Cardoso, F.F.S.S.; Abreu, F.C.; Mundin, I.M.; Souza, W.C.; Caçula, A.C.C.S.M.; Morais, D.C.; Lima, L.G. Comparação da bioequivalência entre duas formulações de olanzapina 2,5 mg comprimidos em voluntários sadios após a administração de dose única. **Revista Brasileira de Medicina**, v.69, n.7, p.1-8, 2012.

Costa, J.A.S.; Andrade, K.V.F. Perfil dos usuários incluídos no protocolo de esquizofrenia em um programa de medicamentos do componente especializado da assistência farmacêutica. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v.35, n.2, p.446-456, 2011.

Darvesh, A.S.; Carroll, R.T.; Geldenhuys, W.J.; Gudelsky, G.A.; Klein, J.; Meshul, C.K.; and Van der Schyf, C.J. *In vivo* brain microdialysis: advances in neuropsychopharmacology and drug discovery. **Expert Opin Drug Discovery**, v. 6, p. 109–127, 2011.

Davanço, M.G. **Farmacocinética do benznidazol administrado em coelhos na forma de comprimidos de liberação imediata e comprimidos de liberação prolongada**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista. 2015. 151p.

Delgado, J.M.R.; DeFeudis, F.V.; Roth, R.H.; Ryugo, D.K.; Mitraka, B.K. Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys. **Archives International Pharmacodynamie et therapie**, v.198, p. 9–21, 1972.

Dhanani, J.; Roberts, J.A.; Chew, M.; Lipman, J.; Boots, R.J.; Paterson, D.L.; Fraser, J.F. Antimicrobial chemotherapy and lung microdialysis: a review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, p.491-500, 2010.

Dixit, M.; Kini, A.G.; Kulkarni, P.K. Enhancing the aqueous solubility and dissolution of olanzapine using freeze-drying. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 743-749, 2011.

DSM-IV: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. 4^a edição. Porto Alegre, Artes Médicas, 1995.

Ferreira, A.A.A.; Sena, G.S.; Galvão, M.V.M.; Felix, R.H.M.; Mendonça, R.M.; Guerra, G.C.B.; Rodrigues, F.C. Schizophrenia temporal trend: a study in a hospital setting. **Journal Brasileiro de Psiquiatria**, v.56, n.3, p.157-161, 2007.

Fonseca, M.S.B.S. **Monitorização terapêutica da olanzapina em pacientes esquizofrênicos.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2009. 221p.

Food and Drug Administration - FDA. Guidance for Industry: Statistical Approaches to Establishing Bioequivalence. 2001. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070244.pdf>.

Food and Drug Administration - FDA. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.DrugDetails> Acessado em fevereiro de 2014.

Fraga, C.A.M.; Menegatti, R.; Barreiro, E.J.; Neves, G.; Betti, A.H.; Kliemann, M.; Rates, S.M.K.; Tasso, L.; Conrado, D.J.; Costa, T.D.; Oliveira, V.; Noël, F. Descoberta de novos protótipos *N*-fenilpiperazínicos heteroarilazólicos candidatos a fármacos antipsicóticos atípicos. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n.1, p.28-37, 2010.

Freddo, R.J. **Estudos para obtenção e caracterização de sistemas nanoparticulados contendo ácido valpróico e avaliação da penetração na barreira hematoencefálica.** Tese de doutorado. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. 124p.

Garcés-Ramírez, L.; Green, J.L.; Hiranita, T.; Kopajtic, T.A.; Mereu, M.; Thomas, A.M.; Mesangeau, C.; Narayanan, S.; McCurdy, C.R.; Katz, J.L.; Tanda, G. Sigma Receptor Agonists: Receptor Binding and Effects on Mesolimbic Dopamine Neurotransmission Assessed by Microdialysis. **Biological Psychiatry**, v.69, p.208–217, 2013.

Guesdon, B.; Denis, R.G.P.; Richard, D. Additive effects of olanzapine and melaninconcentrating hormone agonism on energy balance. **Behavioural Brain Research**, v. 207, p.14–20, 2010.

Hou, J.; Liu, Q.; Li, Y.; Sun, H.; Zhang, H. An *In Vivo* Microdialysis Study of FLZ Penetration through the Blood-Brain Barrier in Normal and 6-Hydroxydopamine Induced Parkinson's Disease Model Rats. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

Kaul, S.; Williams, T.D.; Lunte, C.E.; Faiman, M.D. LC-MS/MS determination of carbamathione in microdialysis samples from rat brain and plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.51, p.186–191, 2010.

- Kraepelin E. **Dementia praecox and paraphrenia.** (From the German 8th Edition of the Textbook of Psychiatry ed.) Edinburgh: E & S Livingstone; 1919.
- Labaune, J.P. **Farmacocinética.** São Paulo, 1993, 198p.
- Leung, J.Y.T.; Pang, C.C.Y.; Procyshyn, R.M.; Barr, A.M. Cardiovascular effects of acute treatment with the antipsychotic drug olanzapine in rats. **Vascular Pharmacology**, n. 62, p. 143–149, 2014.
- LeBlanc, P.P.; Aiache, J.M.; Besner, J.G.; Buri, P.; Lesne, M. **Tratado de biofarmácia e farmacocinética.** Lisboa, 2000. 396p.
- Leveque, N.; Makki, S.; Hadgraft, J.; Humbert, P. Comparison of Franz cells and microdialysis for assessing salicylic acid penetration through human skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.269, p. 323–328, 2004.
- Li, Y.; Peris, J.; Zhong, L.; Derendorf, H. Microdialysis as a Tool in Local Pharmacodynamics. **The AAPS Journal**, v.8, n.2, p.E222-E224, 2006.
- Lietsche, J.; Gorkab, J.; Hardta, S.; Karasb, M.; Kleina, J. Self-built microdialysis probes with improved recoveries of ATP and neuropeptides. **Journal of Neuroscience Methods**, v.237, p.1–8, 2014.
- Lira, E.C. **Efeito Anticatabólico dos Derivados de Xantina no Metabolismo de Proteínas em Músculo Esquelético de Ratos Sépticos: Um Estudo de Microdiálise.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. 2006. 79p.
- Lönnroth, P., Jansson, P.A., Smith, U. A microdialysis method allowing characterization of intercellular water space in humans. **American Journal of Physiology**, v.253, p.228-231. 1978.
- Mello, M.H. **Avaliação de dados antropométricos, hemodinâmicos e metabólicos em pacientes esquizofrênicos que utilizam a olanzapina.** Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP, 2009, 96p.
- Mitchell, M.; Kothare, P.; Bergstrom, R.; Zhao, F.; Jen, K.Y.; Walker, D.; Johnson, J.; McDonnell, D. Single and multiple dose pharmacokinetic, safety, and tolerability profiles of olanzapine long-acting injection: an open-label, multicenter, nonrandomized study in patients with schizophrenia. **Clinical Therapeutics**, v.35, n.12, p.1890-1908, 2013.
- Moskowitz, A.; Heim, G. Eugen Bleuler's Dementia Praecox or the Group of schizophrenias (1911): A Centenary Appreciation and Reconsideration. **Schizophrenia Bulletin**, v.37, n.3, p. 471–479, 2011.
- Moura, J.R. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica aplicável ao desenvolvimento farmacotécnico de comprimidos de olanzapina.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás, 2009, 48p.

Moreira, R.F. **Determinação do perfil farmacocinético de medicamentos contendo fármacos de ação central aplicados à clínica.** Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. 2014. 144p.

Müller, M. **Microdialysis in Drug Development.** New York, 2012. 342p.

Munari, L. **Avaliação do efeito de um extrato lipofílico de Hypericum caprifoliatum Cham. & Schleidl sobre os níveis cerebrais de dopamina e seus metabólitos através de microdiálise cerebral em ratos conscientes.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2006. 161p.

Nandi, P.; Lunte, S. M. Recent trends in microdialysis sampling integrated with conventional and microanalytical systems for monitoring biological events: A review. **Analytica Chimica Acta**, v.651, p.1-14, 2009.

Nirogi, R.; Kandikere, V.; Bhyrapuneni, G.; Benade, V.; Saralaya, R.; Irappanavar, S.; Muddana, N.; Ajjala, D.R. Approach to reduce the non-specific binding in microdialysis. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 209, p.379– 387, 2012.

Oliveira, A S.R.S.F. **Conceptualização Histórica da Esquizofrenia.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. 2010a. 37p.

Oliveira, A.R. **Envolvimento de receptores dopaminérgicos da área tegmental ventral e do complexo basolateral da amígdala na aquisição e na expressão do medo condicionado.** Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2010b. 135p.

Organização Mundial de Saúde (OMS) http://www.who.int/mental_health/media/en/55.pdf?ua=1 Acessado em dezembro de 2015a.

Organização Mundial de Saúde (OMS) <http://www.who.int/topics/schizophrenia/es/> Acessado em dezembro de 2015b.

Pervaiz, F.; Ahmad, M.; Minhas, M.U.; Sohail, M. Development and Validation of Reverse Phase High Performance Chromatography Method for Determination of Olanzapine in Microsample Rat Plasma: Application to Preclinical Pharmacokinetic Study. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, p. 141-147, 2015.

Plock, N.; Kloft, C. Microdialysis: theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. **European Journal Pharmaceutical Science**, v.25, p.1-24, 2005.

Poyurovsky, M.; Fuchs, C.; Pashinian, A.; Levi, A.; Faragian, S.; Maayan, R.; Gil-Ad, I. Attenuating effect of reboxetine on appetite and weight gain in olanzapine-treated schizophrenia patients: a double-blind placebo-controlled study. **Psychopharmacology**, v. 192, p. 441–448, 2007.

Poyurovsky, M.; Fuchs, C.; Pashinian, A.; Levi, A.; Weizman, R.; Weizman, A. Reducing antipsychotic-induced weight gain in schizophrenia: a double-blind placebo-controlled study of reboxetine–betahistine combination. **Psychopharmacology**, v. 226, p.615–622, 2013.

- Rang, H., Dale, M. **Farmacologia**. 7^a Ed. Rio de Janeiro, 2012. 808p.
- Rêgo, J.F.; Moura, J.I.; Moita, G.C. Determinação de olanzapina em formulações farmacêuticas por espectrofotometria: desenvolvimento e validação. **Química Nova**, v.33, n.2, p.471-477, 2010.
- Sarin, L.M.; Del Porto, J.A. Antipsicóticos atípicos na depressão refratária. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v.58, n.2, p.73-78, 2009.
- Saavedra, I.; Alarcón, A.; Bustamante, R.; Cáceres, D.; Letelier, M.E.; Quiñones, L. Biodisponibilidad relativa de una formulacion oral de olanzapina del mercado nacional, respecto a la formulacion de referencia internacional. **Revista de Farmacología Chile**, v.2, n.1, p.1-7, 2009.
- Shin, C.; Yu, X.; Cheung, E.F.C.; Shum, D.H.K.; Chan, R.C.K. Revisiting the therapeutic effect of rTMS on negative symptoms in schizophrenia: A meta-analysis. **Psychiatry Research**, v.215, p.505–513, 2014.
- Silva, R.C.B. Esquizofrenia: uma revisão. **Psicologia USP**, v.17, n.4, p.263-285, 2006.
- Silva, S.R.F. **Farmacocinética do diazepam**. Dissertação de mestrado. Universidade Fernando Pessoa, Porto. 2013. 79p.
- Storpirtis, S.; Gai, M.N.; Campos, D.R.; Gonçalves, J.E. **Farmacocinética Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro, 2011. 222p.
- Steiner, J.; Bernstein, H.G.; Bogerts, B.; Gonçalves, C.A. Os possíveis papéis da S100B na esquizofrenia. **Revista Psiquiatria Clínica**, v.40, p.35-40, 2013.
- Tasso, L. **Modelagem farmacocinética e farmacodinâmica das flourquinolonas levofloxacino e gatifloxacino**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008. 151p.
- Torrão, A.L.R.S. **Desenvolvimento de um modelo experimental de inibição de COMT, com microdiálise em ratos Wistar**. Dissertação de mestrado. Universidade do Porto. 2007. 101p.
- Tort, A.B.L. **Sistemas dopaminérgicos e ação antipsicótica: abordagens experimentais e teóricas**. Tese de doutorado. Departamento de bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2005. 155p.
- Tozer, T.N.; Rowland, M. **Introdução à Farmacocinética e à Farmacodinâmica. As bases Quantitativas da Terapia Farmacológica**. Porto Alegre, 2009. 336p.
- Tsai, T.H. **Applications of microdialysis in pharmaceutical science**. New Jersey, 2011. 576p.
- Ungerstedt, U., Pycock, C. Functional correlates of dopamine neurotransmission. **Bull Schweiz Akad Med Wiss**, v. 30, p. 44-55, 1974.

Vargas, T.S.; Santos, Z.E.A. Prevalência de síndrome metabólica em pacientes com esquizofrenia. **Scientia Medica**, v. 21, n.1, p. 4-8, 2011.

Vieira, M.L.T.; Singh, R.P.; Derendorf, H. Simultaneous HPLC analysis of triamcinolone acetonide and budesonide in microdialysate and rat plasma: Application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, v.878, p.2967-2973, 2010.

Zhang, M.; Beyer, C.E. Measurement of neurotransmitters from extracellular fluid in brain by in vivo microdialysis and chromatography–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 492–499, 2006.

Zugno, A.; Barcelos, M.; Oliveira, L.; Canever, L.; Luca, R.; Fraga, D.B.; Matos, M.P.; Rezin, G.T.; Scaini, G.; Búrigo, M.; Streck, E.L.; Quevedo, J. Energy metabolism, leptin, and biochemical parameters are altered in rats subjected to the chronic administration of olanzapine. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.34, p.168-175, 2012.

APÊNDICE A - The development and validation of a method for quantifying olanzapine in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study

Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology (2015) 42, 305–313

doi: 10.1111/1440-1681.12353

ORIGINAL ARTICLE

The development and validation of a method for quantifying olanzapine in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study

Noely Camila Tavares Cavalcanti Bedor, Danilo César Galindo Bedor, Carlos Eduardo Miranda de Sousa, Felipe Nunes Bonifácio, Daniel da Mota Castelo Branco, Leila Bastos Leal and Davi Pereira de Santana

Center of Cosmetic and Pharmaceutical Development, Department of Pharmaceutical Science, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

SUMMARY

Key words: LC-MS/MS, olanzapine, pharmacokinetic study.

1. A rapid method using liquid chromatography tandem mass spectrometry for the quantification of olanzapine (OLZ) in human plasma was developed and validated. Venlafaxine was used as the internal standard (IS), and the samples were extracted from 400- μ L human plasma with methyl *tert*-butyl ether for liquid–liquid extraction.

2. Chromatography was performed using an ACE C18, 125 \times 4.6-mm i.d., 5- μ m column. The mobile phase consisted of water with 0.1% formic acid for solvent A and acetonitrile with 0.1% formic acid for solvent B (50 : 50 v/v) in isocratic mode. The flow rate was 1.2 mL/min. The retention times for OLZ and the IS were 0.78 and 1.04 min, respectively. Tandem mass spectrometry operating in positive electrospray ionization mode with multiple reaction monitoring was used to detect OLZ and the IS (m/z : 313.1 $>$ 256.1 and 278.1 $>$ 260.2, respectively).

3. No significant matrix effects were observed on OLZ and the IS retention times, and the mean recovery of OLZ was 90.08%. The assay was linear in the concentration range of 1–20 ng/mL (R^2 = 0.9976). The intra- and interday precision were < 11.60% and the accuracy was < 1.66%.

4. This validated method was successfully applied to a pharmacokinetic study in which 10-mg OLZ tablets were administered to healthy volunteers and their plasma OLZ levels were monitored over time. The tests showed that the OLZ test and reference drug (Zyprexa[®]) were bioequivalent, as 90% of the confidence intervals were within the 80–125% interval proposed by regulatory agencies.

INTRODUCTION

Olanzapine (OLZ), or 2-methyl-4-(4-methyl-1-piperazinyl)-10H-thienobenzodiazepine (molecular formula C₁₇H₂₀N₄S), with a thienobenzodiazepinyl structure and a molecular weight of 312.44 Da,¹ is an antipsychotic drug with a chemical structure and therapeutic properties that are very similar to those of clozapine.² Olanzapine appears to be effective against both positive (hallucinations and delusions) and negative (poverty of speech and social withdrawal) symptoms of schizophrenia,^{3–6} whereas first-generation antipsychotic drugs (e.g. phenothiazines and butyrophenones) are only effective in the treatment of the positive symptoms of this illness.⁷ Recently, the US Food and Drug Administration approved the use of OLZ for the treatment of acute mania.⁸ Olanzapine is commercially available in dose strengths ranging from 2 to 20 mg in the form of coated oral tablets named Zyprexa[®] (Eli Lilly, Indianapolis, IN, USA) and an oral disintegrating tablet known as Zyprexa[®] Zydis[®] (Eli Lilly).⁹

There are several reports on the analysis of OLZ in biological fluids available in the literature. Most of the analytical methods employed were based on the use of HPLC with ultraviolet or electrochemical detection.^{10–19} The shortcoming of these methods is their limited specificity. The advent of the atmospheric pressure ionization (API) source was a breakthrough that allowed efficient coupling of liquid chromatography (LC) to mass spectrometry (MS), which enables the development of a more sensitive technique.²⁰ The applicability of LC electrospray tandem MS has been demonstrated in a wide range of bioanalytical, environmental, and pharmaceutical applications such as OLZ quantification.^{21–31}

The present study reviewed and compared published methods for determining the presence of OLZ in human plasma. Furthermore, a rapid method using a relatively simple liquid–liquid extraction procedure in combination with liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis was developed and applied to a pharmacokinetic study of OLZ in healthy volunteers.

Correspondence: Dr Danilo Cesar Galindo Bedor, Center of Cosmetic and Pharmaceutical Development, Department of Pharmaceutical Science, Federal University of Pernambuco, 50740-520 Recife, Pernambuco, Brazil. Email: danilo.bedor@ufpe.br

Received 11 June 2014; revision 30 November 2014; accepted 2 December 2014.

© 2014 Wiley Publishing Asia Pty Ltd

RESULTS

The development and validation of the LC-MS/MS method and its operating conditions

The mass spectrometric parameters were optimized to obtain maximum sensitivity at unit resolution. The source temperature was optimized at 115°C, the desolvation temperature was 250°C, and the desolvation gas flow was 400 L/h. The capillary voltage was set at 0.5 kV, while the optimized cone voltage values for OLZ and venlafaxine, used as internal standard (IS), were 35 and 10 V, respectively. The collision energy optimized for OLZ and IS was 30 V for both drugs, with argon as the collision gas at a pressure of 1.88×10^{-3} psi in the collision cell and the multiplier set at 700 V.

The infusion experiments for the multiple reaction monitoring (MRM) optimizations and ion suppression studies were performed with a Harvard Apparatus 11 elite syringe pump (Holliston, MA, USA) at a flow rate of 30 μ L/min. The MRM method prepared included the most intense transitions for OLZ and the IS. Figure 1 shows positive ion electrospray mass spectra of OLZ with the precursor and product ion (m/z : 313.1 > 256.1) and the mass transition, monitored in MRM mode. The spectrum also showed another fragment of OLZ (m/z : 282.1), but its intensity was less than that of the selected fragment (m/z : 256.1). After full-scan monitoring was performed, no fragmentation was observed at the ionization source.

To perform HPLC, an ACE C18 125 \times 4.6-mm i.d., 5- μ m column (ACE, Aberdeen, UK), equipped with a column guard Gemini C18 2 \times 4.6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) was used. Sample volumes of 10 μ L were injected, followed by a 0.8-mL strong needle wash consisting of 0.5% formic acid in acetonitrile : 2-propanol : water (45 : 10 : 45, v/v/v) to avoid the carry-over phenomenon. The mobile phase consisted of water with 0.1% formic acid for solvent A and acetonitrile with 0.1% formic acid for solvent B (50 : 50 v/v) in isocratic mode. A flow rate of 1.2 mL/min was used, with a split of nine volumes

discarded and one volume for the mass spectrometer (0.12 mL/min). The column oven was set at room temperature (21–23°C). The retention times for OLZ and the IS were 0.78 and 1.04 min, respectively, and the analytical run was 2 min.

Validation of method

The applied method demonstrated excellent specificity with no endogenous or metabolite interferences with the retention times for OLZ and the IS (Fig. 2), even with low chromatographic retention and an analytical run time of 2 min. The cross-talk test showed no interference between the MRM channels of OLZ and the IS despite the low chromatographic resolution between the compounds analysed. The carry-over test showed no interference between the samples in an analysis sequence.

For linearity evaluation, weighted least square linear regression was used to obtain the linearity over one order of magnitude (1–20 ng/mL (1/ μ g)), with a mean determination coefficient of 0.9976 (during three analytical runs); the accuracy of the back-calculated results was between 92.61% and 106.64% (Table 1). As shown by the back-calculated concentration, this method was reliable and valid. The low limit of quantification (LLOQ) was 1 ng/mL.

The chromatograms of the extracted human plasma contained a low (1 ng/mL) concentration of OLZ and the IS, and they appeared to offer a good detector response to both compounds. The signal/noise relationship was 76.6 for the LLOQ and 800.0 for the IS peak.

The matrix effect (ME), recovery (REC), and process efficiency (PE) were 93.29%, 90.08%, and 88.78%, respectively, and were consistent over the tested concentration ranges of the analytes.

According to the recovery evaluation and the post-extraction spiked samples, the results of the matrix effects showed no significant influence of the biological matrix on the OLZ analytical response. Thus, ion suppression or enhancement by the plasma matrix was negligible for this method. Intra- and inter-day precision and accuracy at low quality control (LQC), medium quality

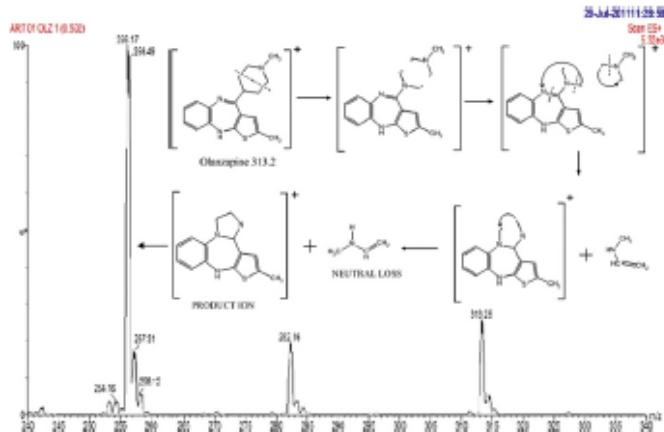


Fig. 1 Electrospray ionization product ion scan of olanzapine, obtained using the triple quadrupole spectrometer. OLZ, olanzapine.

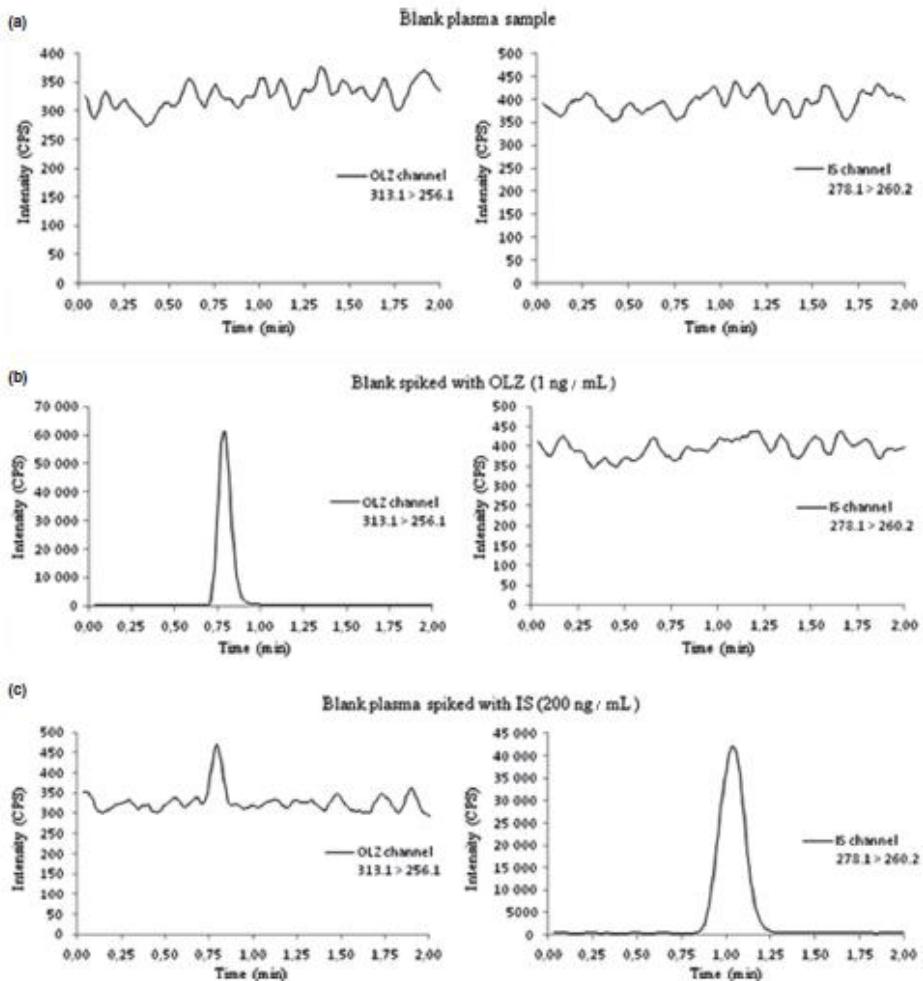


Fig. 2 (a) Total ion chromatograms of blank plasma, (b) blank plasma spiked with 1 ng/mL OLZ standard, and (c) blank plasma spiked with 200 ng/mL of the IS. CPS, counts per second; IS, internal standard; OLZ, olanzapine.

control (MQC), and high quality control (HQC) enabled satisfactory results with a relative standard deviation $< 11.60\%$ and a relative error $< 1.66\%$ (Table 2). The data obtained for OLZ are in accordance with the acceptable limits set forth in the guidelines for bioanalytical methods of validation.³²

Stability studies

The stability data regarding OLZ in plasma under different temperatures, time conditions, and freeze–thaw cycles demonstrated that

the calculated concentrations for the controls did not change significantly over the course of the study and that the conditions were appropriate for pharmacokinetic study design (Table 3). The stock solution stability was stable for 6 h at room temperature and for 5 days under refrigerated conditions (4°C). Both the analyte and the IS in the quality control human plasma were stable for at least 6 h at room temperature (bench-top stability), for at least 8 h in the autosampler (4°C), and for a minimum of three freeze–thaw cycles. Spiked plasma samples, stored at -70°C to determine long-term stability, were stable for a minimum of 56 days.

Application of the method: a pharmacokinetic study

The developed method was successfully applied to a pharmacokinetic study in which the concentration of OLZ was measured in plasma samples from 28 healthy volunteers after a single oral dose of a 10-mg OLZ tablet.

The mean concentration-time profile is shown in Fig. 3. The mean values of the pharmacokinetic parameters were as follows: the maximum plasma concentration (C_{max}), the time to reach the peak concentration (T_{max}), and the area under the concentration-time curve (AUC_{0-t} and $AUC_{0-\infty}$) (Table 4). These findings were in agreement with published data.^{31,37} No statistically significant differences were found between the pharmacokinetic parameters of the test and reference formulation; the confidence interval of the C_{max} was 83.15–99.23 and that of the AUC_{0-t} was 80.07–92.51.

Tolerability

During the first period of the study, 100% of the volunteers reported sleepiness and 13.79% reported nausea as a result of the OLZ test and reference product. No clinical abnormalities were found at the end of the study.

DISCUSSION

A mass spectrometer was set up to obtain a maximum signal without fragmentation in the source ionization and an MRM with the most sensitive and stable fragment to obtain a high signal/noise ratio. Bogusz *et al.*²¹ described an atmospheric pressure chemical ionization-MS/MS method with an LLOQ of 1 μ g/mL.

Table 1 Accuracy and precision of linearity

Spiked concentration (ng/mL.)	Determined concentration (ng/mL.) (mean \pm SD) ($n = 3$)	Precision (%)	Accuracy (%)
1	0.927 \pm 0.060	6.50	92.61
1.5	1.600 \pm 0.098	6.16	106.64
3	2.923 \pm 0.166	5.68	97.43
6	5.865 \pm 0.099	1.69	97.75
10	9.348 \pm 0.647	6.93	93.48
13	12.183 \pm 0.991	7.48	93.72
16	16.529 \pm 2.037	12.33	103.31
20	20.213 \pm 0.902	4.46	101.07

Kratzsch *et al.*²⁷ described an atmospheric pressure chemical ionization-MS method with an LLOQ of 5 ng/mL. The comparison between atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization method showed that the latter produced the most intense signal. In addition, the ionization was operated in positive ion mode, as both OLZ and the IS are basic compounds with pKa values of 7.24 and 8.91, respectively.³²

Several bioanalytical methods with a low LLOQ are described for the analysis of biological matrices (human plasma,^{8,22,26,27,30,31,37} human serum,^{21,25,29} whole blood,^{23,28} cerebrospinal fluid,²⁹ and urine³⁴) using LC-MS/MS. The most sensitive method described shows an LLOQ of 0.05 ng/mL; the method uses a long solid phase extraction sample preparation technique consisting of nine steps, and it employs API-3000 equipment (MDS SCIEX, Foster City, CA, USA). In addition, other liquid-liquid extraction methods with low LLOQ have been described, including an LLOQ of 0.1 ng/mL with a large volume of organic solvent (4-mL diethyl ether/ dichloromethane (7 : 3, v/v)) and API-4000 equipment (MDS SCIEX, Foster City).⁸ Josefsson *et al.*²⁹ described a method that uses a large volume of organic solvent (2-mL methyl *tert*-butyl ether (MTBE)) and API 4000 equipment (MDS SCIEX, Foster City), with an LLOQ of 5 and 0.2 ng/mL for human plasma and cerebrospinal fluid, respectively. Organic solvent (1.5-mL MTBE) and an old generation of mass spectrometer (Quattro LC system; Waters Corporation, Milford, MA, USA) were used in this method; this method has an LLOQ of 1 ng/mL, which was sufficient for $AUC_{0-72\text{ h}}$ calculation.

Table 3 Stability data of the human plasma OLZ assay

Stability test	Olanzapine ($n = 5$)		
	Concentration (ng/mL.)	Precision (RSD %)	Accuracy (RE %)
Bench-top stability	3	5.15	-2.30
	18	2.15	-1.36
Autosampler stability	3	2.11	1.22
	18	3.18	1.63
Freeze-thaw stability	3	5.96	-5.33
	18	3.59	-6.31
55-day storage stability	3	5.08	2.18
	18	3.59	0.41
Solution stability	3	3.15	6.03
	18	2.21	12.27

OLZ, olanzapine; RE, relative error; RSD, relative standard deviation.

Table 2 The precision and accuracy results of the validation method

Spiked concentration (ng/mL.)	Intra-day (ng/mL.) ($n = 5$)			Inter-day (ng/mL.) ($n = 15$)		
	Day 1 Mean (RSD) (%)	Day 2 Mean (RSD) (%)	Day 3 Mean (RSD) (%)	Mean	Precision (RSD %)	Accuracy (RE %)
1	1.03 (5.1)	0.99 (14.6)	0.94 (8.6)	0.99	11.60	-1.44
3	2.96 (1.5)	3.15 (5.5)	2.76 (3.1)	2.96	6.62	-1.48
9	8.34 (2.6)	9.35 (3.5)	9.12 (1.1)	8.94	5.62	-0.70
18	16.37 (2.6)	18.62 (2.5)	18.11 (6.4)	17.70	6.88	-1.66

RE, relative error; RSD, relative standard deviation.

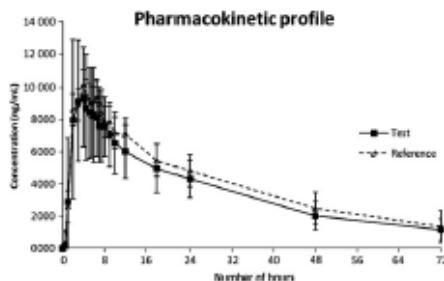


Fig. 3 Representative data showing the plasma concentration-time profiles of 28 healthy subjects after the administration of a single oral dose of 10-mg OLZ (reference vs test product). OLZ, olanzapine.

Of the 10 LLOQ methods described above, only three had an analytical run time of 2 min: Patel *et al.*,³¹ Bonde *et al.*,³² who used solid phase extraction and API-4000 (MDS SCIEX, Toronto, ON, Canada), and the present study. Additionally, the current method showed a rapid analytical run time (2 min) with liquid-liquid extraction and Quattro LC.

The major advantages of this method are its simple sample preparation, the short run time (2 min), the robustness for high throughput analysis (1176 volunteer samples analysed), and good sensitivity (10-mg OLZ tablet *in vivo* evaluation), which are all important when dealing with large batches of samples in pharmacokinetic studies. The pharmacokinetic parameters were in agreement with published data.³¹

We proceeded with a comparison of the pharmacokinetic parameters reported in the literature.^{1,33–36} Table 4 shows the results of the C_{max} , AUC_{0-t} , and $AUC_{0-\infty}$ of studies on subjects of different ethnicities (Chinese, Thai, Iranian, and Egyptian) that were performed on healthy male volunteers (except for the Thai study, which included 12 men and 12 women). The studies were open-label, randomized, two-period, two-treatment, two-sequence, and 2×2 crossover, and were performed under fasting conditions; the plasma levels after the administration of a 10-mg OLZ tablet were determined. Based on statistical analysis by nonparametric evaluation with the Games-Howell test, ethnicity was found to have an influence on the rate and extension of bioavailability. The two Chinese studies and the Thai study had a higher C_{max} than that reported by the other studies. This may indicate a significant difference in OLZ metabolism between Asian (Chinese and Thai) and other ethnic groups (Brazilian, Iranian, and Egyptian), which may be due to pharmacogenetic factors.

The metabolism of OLZ occurs in the liver by the *CYP1A2* and *CYP2D6* isoforms of cytochrome P450. The varying values of the pharmacokinetic parameters of the different ethnic groups could be explained by the metabolic processing of OLZ, particularly the oxidative process mediated by the cytochrome P450 isoenzyme *CYP1A2* and, to a minor degree, by that of *CYP2D6*.³³ The presence of defective *CYP2D6*10* alleles in Asians (Chinese and Thai) may be present in as much as 50% of the Asian population and is responsible for the diminished enzyme activity observed in intermediate metabolizers.³⁹ In addition, the *CYP1A2* gene polymorphism was found to influence the haplotype distribution in Korean, Japanese, and Chinese (Asian) subjects differently than in Africans.

Table 4 Pharmacokinetic parameters and statistical analysis of the reference and test drugs in the present method and other published methods

Ethnic group, number of volunteers, gender, pharmaceutical dosage, collection time of last sample	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	AUC_{0-t} (ng·h/mL·h)		$AUC_{0-\infty}$ (ng·h/mL·h)		References	
			Ref.	Test	Ref.	Test		
Brazilian ($n = 25$), M, 10-mg tablet, 72 h	12.50 ± 3.75	11.47 ± 3.65	4.30 ± 2.37	4.50 ± 1.85	283.12 ± 94.84	240.97 ± 78.46	345.21 ± 110.03	375.88 ± 383.65 Present
Chinese ($n = 24$), M, 10-mg tablet, 72 h	18.44 ± 4.758	18.90 ± 5.320	ND	ND	587.9 ± 127.12	582.9 ± 118	615.8 ± 137.45	615.4 ± 131.39 Chen <i>et al.</i> ³⁴
Chinese ($n = 20$), M, 10-mg tablet, 144 h	22.44 ± 5.30	21.05 ± 5.81	3.2 ± 0.6	3.2 ± 0.8	607.43 ± 141.07	630.19 ± 177.73	649.39 ± 132.01	673.33 ± 174.74 Cao <i>et al.</i> ³⁵
Chinese ($n = 20$), M, 10-mg tablet, 144 h	26.4 ± 8.45	27.6 ± 8.45	3.00 (1.00–6.00)	3.53 (1.00–6.00)	805 ± 313	835 ± 345	863 ± 366	901 ± 468 Chaeinchanakul <i>et al.</i> ³⁶
Thai ($n = 24$), M/F, 10-mg tablet, 120 h	15.72 ± 4.25	15.82 ± 19.91	6.25 ± 1.22	5.07 ± 2.31	440.37 ± 98.75	447.19 ± 100.64	558.66 ± 129.57	570.75 ± 130.55 Zakeri-Milani <i>et al.</i> ³⁵
Iranian ($n = 24$), M, 10-mg tablet, 72 h	11.60 ± 4.08	13.07 ± 4.47	6.42 ± 4.04	6.04 ± 2.77	367.26 ± 119.22	363.38 ± 129.68	477.98 ± 137.38	466.87 ± 165.38 Eshkefy <i>et al.</i> ¹
Egyptian ($n = 24$), M, 10-mg tablet, 72 h								

Figures are either mean ± SD or mean ± SE. Study design of all cases reported in the table: open-label, randomized, two-period, two-treatment, two-sequence, 2×2 crossover, fasting conditions. The reference drug used in all cases was Zyprexa®. AUC , area under the concentration-time curve; C_{max} , maximum plasma concentration; M, male; ND, not described; Ref., reference drug; T_{max} , time to reach peak concentration.

and Europeans. This could contribute to the differences in pharmacokinetic profiles between the ethnic populations.⁴⁰ The C_{max} determined in the present study is in accordance with the previously reported Iranian and Egyptian studies.^{1,33}

The high C_{max} value found in the Asian studies could explain the high number of adverse events in the Thai study.³⁵ A total of 108 adverse events were reported (50 from the test product and 58 of the reference product); all adverse events were mild and no serious adverse effects were observed.³⁵ In contrast, the current study showed 68 adverse events (33 from the test product and 35 from the reference product). The AUC_{0-t} was not evaluated because different sample collection times were used.

METHODS

Chemicals

Olanzapine's reference standard was acquired from the US Pharmacopeial Convention (Rockville, MD, USA), and venlafaxine (the IS) was obtained from the European Pharmacopoeia (Strasbourg, France) (Fig. 1). Formic acid, MTBE, and acetonitrile, all HPLC grade, were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Water was purified with a MilliQ[®] system from Millipore (Millipore, Molsheim, France). Control human plasma was obtained from six different healthy volunteers; plasma was used separately for specificity measurements and pooled for the preparation of the standard and quality control samples.

Equipment

A Jouan M23i refrigerated centrifuge (St. Herblain, France) was used for sample extraction. Samples were stored at -70°C in a REVCO freezer (Asheville, NC, USA) until analysis. The LC electrospray tandem MS instrumentation for isocratic reversed phase chromatography consisted of an LC 10ADvp HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) that was equipped with two pumps (LC 10ADvp), a column oven (CTO 10Avp), an autosampler (SIL 10ADvp), and a system controller (SCL 10Avp). Mass detection was performed on a Quattro LC system and instrument control; integration and calculation were performed using the MASSLINC[®] 4.1 software package (Micromass, Milford, MA, USA).

LC-MS/MS conditions

The chromatographic conditions, including the mobile phase composition, flow rate, stationary phase, and injection volume, were optimized. Acetonitrile and methanol were evaluated as organic modifiers (varying from 10% to 80%) with water, ammonium acetate, and ammonium formate buffers varying from 2 to 10 mmol/L. Formic acid was added to increase the ionization to positive-mode electrospray ionization, with detecting concentrations ranging from 0.05% to 0.5%. The flow rate was evaluated as 0.4–1.2 mL/min. Some analytical columns were evaluated by varying the stationary phase (C8 and C18) and length (50–150 mm), all with an i.d. of 4.6 mm and particle size of 5 μm . The injection volumes were evaluated over a range of 2–30 μL . The aim was to obtain a separation of OLZ and the IS with a good peak shape (asymmetry between 0.9 and 1.2) and the shortest possible total run time without biological matrix interference.

After the chromatographic conditions for the analysis were determined, the ionization source was optimized. The source and desolvation gas temperature, distance from probe to cone, and gas flow were adjusted to maximize the signal and to increase the signal/noise ratio.

Preparation of the working solutions and quality control standards

Stock solutions of OLZ and the IS (1 mg/mL) were prepared by dissolving and diluting the drugs into the required concentrations of acetonitrile (10, 15, 30, 60, 90, 100, 130, 160, 180, and 200 ng/mL) for OLZ. The IS working solution was also prepared in acetonitrile at a concentration of 1000 ng/mL. The calibration curves for OLZ were prepared in human plasma at eight concentrations (1.0, 1.5, 3.0, 6.0, 10.0, 13.0, 16.0 and 20.0 ng/mL), and all concentration levels were reached with the same dilution factor. Quality control samples were also prepared in human plasma at 3, 9, and 18 ng/mL (LQC, MQC and HQC, respectively). For the infusion studies of the MS optimization, the samples were prepared at a concentration of 200 ng/mL in water : acetonitrile (50 : 50 v/v).

Sample preparation

Plasma samples (400 μL) were transferred to a 2-mL polypropylene vial to which the IS (50 μL , 1000 ng/mL) and 1.5-mL MTBE were added and vortex mixed for 1 min. The samples were centrifuged for 5 min at 3000 $\times g$. The aqueous phase was then discarded and the organic phase was transferred to 2-mL glass vials. The solvent was evaporated to dryness at 40°C under a stream of nitrogen. The residue was re-dissolved in 250- μL acetonitrile : water (1 : 1 v/v), of which 200 μL was transferred into a 250- μL glass vial and placed in the autosampler for analysis.

Validation of the method

The experiment to assess the ME, REC, and PE was determined by using three OLZ quality control validation samples (LQC, MQC and HQC). Three batches of samples were prepared. The first batch was prepared in acetonitrile : water (1 : 1 v/v) (A), the second batch consisted of extracted blank plasma spiked with OLZ in acetonitrile : water (1 : 1 v/v) (B), and the third batch included plasma samples with pre-extraction spiked OLZ (C). The average peak area responses ($n = 6$) were used to calculate the ME, REC, and PE. The calculations were as follows: ME (%) = $(B/A \times 100)$; REC (%) = $(C/B \times 100)$ and PE (%) = $(C/A \times 100)$, where A, B, and C refer to the prepared solutions.⁴¹

For precision (relative standard deviation) and accuracy (relative error) studies, three quality control samples were prepared with five replicates each, and then analysed on the same day (intra-day precision and accuracy) and on three consecutive days (inter-day precision and accuracy). Linearity was evaluated using three different calibration curves, where the determination coefficient and R^2 were calculated along with the precision and accuracy of each concentration level of the calibration curve.

Additionally, the stability of the solutions and plasma samples were evaluated during the method validation. OLZ stock solutions and OLZ in human plasma were analysed at two quality control levels, LQC and HQC (corresponding to 3 and 18 ng/mL, respec-

tively), both after incubation for 6 h at room temperature (21–23°C) and after 5 days at 4°C. Post-extracted samples were kept in the autosampler at 4°C; non-extracted samples were kept at room temperature (21–23°C) (short term) and at –70°C (long term), followed by three freeze-thaw cycles (24 h each cycle). All samples were compared to nominal concentrations and freshly prepared OLZ samples at the same concentration level. The temperatures and test durations were chosen based on relevant clinical laboratory conditions and pharmacokinetic study design.

Selection of volunteers

Twenty-eight healthy Brazilian men, age 18–45 years, volunteered for and were included in this study based on their medical history, physical examination, 12-lead electrocardiography, and laboratory tests (haematology, blood biochemistry, hepatic function, and urinalysis) carried out before the study and at its conclusion. Inclusion criteria were weight within 15% of the ideal body weight; absence of heart, kidney, neurological, or metabolic diseases; and no history of drug hypersensitivity. Exclusion criteria were abnormal values on physical examination, electrocardiography, or laboratory tests; ongoing pharmacological treatment; and history of alcohol or drug abuse. Volunteers were instructed to abstain from taking any medication 1 week before the study and during the study. All subjects signed the consent form approved by the Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco (CAAE – 0224.0.172.000-09).

Study design

The study was an open-label, randomized, two-period, two-treatment, two-sequence, 2×2 crossover trial, balanced investigation of a single oral dose of OLZ (10-mg tablet) and a coated oral tablet (Zyprexa) to evaluate the relative oral bioavailability of these formulations. Subjects were randomly assigned to one of two groups. During the first study period, the volunteers in one group received a single 10-mg dose of the reference product (Zyprexa), while the volunteers in the other group received a single 10-mg dose of the test product (OLZ; Cristália, São Paulo, Brazil) according to a randomization schedule. In the second study period, the order of the groups was reversed.

The products were administered in the morning with 300-mL water after a 10-h fasting period. No food was allowed for 3 h and 15 min after ingestion of the dose. Subjects in both groups were provided with standard meals: lunch, a snack, and supper 3 h and 15 min, 8 h, and 12 h, respectively, after drug administration. The volunteers did not ingest any alcoholic beverages or food and drinks containing caffeine or xanthine during the trial.

Venous blood samples (8 mL) were collected before dosing and at 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 9.0, 10.0, 12.0, 18.0, 24.0, 48.0, and 72.0 h after dosing. Following centrifugation for 5 min at 3000 $\times g$, plasma samples were stored in polypropylene cryogenic tubes at –70°C until analysis.

Pharmacokinetic and statistical analysis

The pharmacokinetic parameters of OLZ determined for the reference and test formulations were the C_{max} , T_{max} , AUC_{0-t} and $AUC_{0-\infty}$, K_d (elimination rate constant) and $T_{1/2}$ (elimination

half-life) calculated by non-compartmental analysis using WINNON-LIN® version 5.2.1 (Pharsight Corporation, Sunnyvale, CA, USA).

The C_{max} and T_{max} were obtained directly from the concentration-time curve. The AUC_{0-t} was estimated by integration using the trapezoidal rule from time zero to the last measurable concentration at time t . K_d was calculated through the application of a log-linear regression analysis to at least the last three quantifiable concentrations of OLZ. $T_{1/2}$ was calculated as $0.693/K_d$ and $AUC_{0-\infty}$ was calculated as $AUC_{0-t} + C_t/K_d$, where C_t is the last measurable OLZ concentration.

ANOVA was performed on logarithmically transformed values of the pharmacokinetic parameters C_{max} , AUC_{0-t} , and $AUC_{0-\infty}$. The ANOVA model included the sequence, formulation, and period as fixed effects, while subjects nested within the sequence were modelled as random effect. These effects were tested at the 5% level of significance.⁴²

To determine the bioequivalence between the products, 90% confidence intervals were calculated for the ratio of the C_{max} and AUC_{0-t} values for the test and reference products, with logarithmically transformed data. The products were considered bioequivalent if the 90% confidence interval for AUC_{0-t} and C_{max} fell within 80–125%.^{43–45}

Tolerability

Tolerability was assessed by a clinician who monitored vital signs (blood pressure in the upper arm based on sphygmomanometry and heart rate) at admission to the hospital, before drug administration, and at 3.0, 7.5, 10.0, 18.0, 24.0, 48.0, and 72.0 h after drug administration. The subjects were interviewed at each sampling time and at each meal, and adverse events spontaneously reported during the course of the study were registered.

CONCLUSIONS

We have described a simple and rapid LC-MS/MS method for the quantification of OLZ in human plasma, which showed an acceptable precision and adequate sensitivity. This method was successfully applied to a clinical pharmacokinetic study of OLZ (10-mg tablets) in healthy male volunteers. The results of the comparison analysis of the pharmacokinetics are in accordance with similar published studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Center of Cosmetic and Pharmaceutical Development, Department of Pharmaceutical Science, Federal University of Pernambuco and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), for providing funding and the infrastructure, workspace, and equipment to perform this study.

REFERENCES

1. Elshafey AH, Elsherbiny MA, Fathallah MM. A single-dose, randomized, two-way crossover study comparing two olanzapine tablet products in healthy adult male volunteers under fasting conditions. *Clin. Ther.* 2009; 31: 600–8.
2. Fulton B, Goa KL. Olanzapine: A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in the management of schizophrenia and related psychoses. *Drugs* 1997; 53: 281–98.

3. Beasley CM Jr, Tollefon G Jr, Tran P, Sameroff W, Sanger T, Hamilton S. Olanzapine versus placebo and haloperidol: Acute phase results of the North American double-blind olanzapine trial. *Neuro-psychopharmacology* 1996; 14: 111-23.
4. Gerlach J, Peacock L. New antipsychotics: The present status. *Int Clin Psychopharmacol* 1995; 10: 39-48.
5. McCormick PL, Wiseman LR. Olanzapine: A review of its use in the management of bipolar I disorder. *Drugs* 2004; 64: 2709-26.
6. Sahl SM. *Psychopharmacology of Antipsychotics*, 1st edn. Martin Dunitz, London, 1999.
7. Raggi MA, Casamenti G, Mandrioli R, Volterrani V. A sensitive high-performance liquid chromatographic method using electrochemical detection for the analysis of olanzapine and desmethylolanzapine in plasma of schizophrenic patients using a new solid-phase extraction procedure. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 750: 137-46.
8. Ningi RVS, Kandikere VN, Shukla M, et al. Development and validation of a sensitive liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry assay for the quantification of olanzapine in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 41: 935-42.
9. Food and Drug Administration. *Medication Guide: Zyprexa® (Olanzapine) Tablet and Zyprexa® Zydus® (Olanzapine)*. 2009. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DrugSafety/UCM134700.pdf> (accessed 22 December 2014).
10. Olesen OV, Poulsen B, Linnet K. Fully automated on-line determination of olanzapine in serum for routine therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 2001; 23: 51-5.
11. Boulton DW, Markowitz JS, DeVane CL. A high-performance liquid chromatography assay with ultraviolet detection for olanzapine in human plasma and urine. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 759: 319-23.
12. Dusci LJ, Hackett LP, Fellows LM, Ilett KF. Determination of olanzapine in plasma by high-performance liquid chromatography using ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2002; 773: 191-7.
13. Llorca PM, Couderc F, Corpelet C, Buyens A, Hoareau M, Eschallier A. Integration of olanzapine determinations in a HPLC-diode array detection system for routine psychotropic drug monitoring. *Clin Chem* 2001; 47: 1719-21.
14. Titzer K, Boucher S, Pehouinq F, Moore N, Molinard M. High-performance liquid chromatographic method with diode array detection to identify and quantify atypical antipsychotics and haloperidol in plasma after overdose. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2003; 788: 179-85.
15. Kasper SC, Mamtani EI, Swanson SP, Chiu JA, Johnson JT, Garner CO. Determination of olanzapine in human breast milk by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 726: 203-9.
16. Amvagiri M, Ames D, Wirsching WC, Mander SR. Plasma level monitoring of olanzapine in patients with schizophrenia: Determination by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Ther Drug Monit* 1997; 19: 307-13.
17. Bao J, Potts BD. Quantitative determination of olanzapine in rat brain tissue by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 752: 61-7.
18. Bergemann N, Fricke A, Perner P, Kopitz J. Olanzapine plasma concentration, average daily dose, and interaction with co-medication in schizophrenic patients. *Pharmacopsychiatry* 2004; 37: 63-8.
19. Catlow JT, Barton RD, Clemens M, Gillespie TA, Goodwin M, Swanson MP. Analysis of olanzapine in human plasma utilizing reversed phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995; 668: 85-90.
20. Raymond NX, Leimin F, Mathew JR, Tawakol AE. Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 44: 342-55.
21. Bogusz MJ, Kruger KD, Maier RD, Erikwold R, Tuchtenhagen F. Monitoring of olanzapine in serum by liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 732: 257-69.
22. Kollnoser M, Schober C. Direct-injection high performance liquid chromatography ion trap mass spectrometry for the quantitative determination of olanzapine, clozapine and N-desmethylclozapine in human plasma. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002; 16: 126-72.
23. Berna M, Ackermann B, Ruterbories K, Class S. Determination of olanzapine in human blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 567: 163-8.
24. Urdigere AKR, Besagurbally BL, Basaviah K. Sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of olanzapine in human urine. *Arab J Sci Eng* 2012; 37: 1381-7.
25. Chin C, Zhang ZP, Karnes HT. A study of matrix effects on an LC-MS/MS assay for olanzapine and desmethyl olanzapine. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 35: 1149-67.
26. Zhou Z, Li X, Li K, et al. Simultaneous determination of clozapine, olanzapine, risperidone and quetiapine in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 802: 257-62.
27. Krausch C, Peters PT, Kmener T, Weber AA, Maurer HH. Screening, library-assisted identification and validated quantification of fifteen neuroleptics and three of their metabolites in plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *J Mass Spectrom* 2003; 38: 283-95.
28. Nielsen MKK, Johansen SS. Determination of olanzapine in whole blood using simple protein precipitation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2009; 33: 212-7.
29. Josefsson M, Romana M, Skoghe P, Dahl M. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of olanzapine and N-desmethylolanzapine in human serum and cerebrospinal fluid. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 53: 576-82.
30. Gopinath S, Kumar RS, Alexander S, Danabai P. Development of a rapid and sensitive SPE-LC-MS/MS method for the simultaneous estimation of fluoxetine and olanzapine in human plasma. *Biomed Chromatogr* 2012; 26: 1077-82.
31. Patel DS, Shamab N, Patel MC, Patel MN, Shrivastav PS, Sanyal M. LC-MS/MS assay for olanzapine in human plasma and its application to a bioequivalence study. *Acta Pharm Sin B* 2012; 2: 481-94.
32. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. 2001. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf> (accessed 22 December 2014).
33. Zakeri-Milani P, Islambulchilar Z, Ghanbarzadeh S, Valizadeh H. Single dose bioequivalence study of two brands of olanzapine 10 mg tablets in Iranian healthy volunteers. *Drug Res* 2013; 63: 346-50.
34. Chen Q, Zhang M, Liu M, et al. Pharmacokinetics and bioequivalence of 2 tablet formulations of olanzapine in healthy Chinese volunteers: A randomized, open-label, single-dose study. *ArgusArztforschung* 2012; 62: 508-12.
35. Chatsicharoenkul S, Niyomnaitham S, Pongnarin P, Sathirakul K, Kongpatanakul S. Bioequivalence study of 10 mg olanzapine tablets in healthy Thai volunteers. *J Bioequival Availab* 2011; 3: 82-5.
36. Cao J, Zhang Z, Tian Y, Liu Y, Rui J. Liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of clonazepam in human plasma and application to a bioequivalence study. *Curr Pharm Anal* 2012; 8: 247-54.
37. Bonde SL, Bhadane RP, Gaikwad A, Gavali SR, Kanale DU, Narendran AS. Simultaneous determination of olanzapine and fluoxetine in human plasma by LC-MS/MS: Its pharmacokinetic application. *J Pharm Biomed Anal* 2014; 90: 64-71.
38. Rao ML. Olanzapine: Pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring. *Fortschr Neurol Psychiatr* 2001; 69: 510-7.
39. Bernard S, Nestile KA, Nguyen AT, Flockhart DA. Interethnic differences in genetic polymorphisms of CYP2D6 in the US population: Clinical implications. *Oncologist* 2006; 11: 126-35.

40. Woo SW, Kang TS, Park HI, Lee JE, Roh J. Comparison of linkage disequilibrium patterns and haplotype structure of eight single nucleotide polymorphisms across the CYP1A2 gene between the Korean and other populations registered in the International HapMap database. *J. Clin. Pharm. Ther.* 2009; 34: 429-36.
41. Manasewski BK, Constanzer ML, Chavez-Esguerra CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* 2003; 75: 3019-30.
42. Chow SC, Liu JP. *Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies*, 2nd edn. Marcel Dekker, New York, NY. 2000.
43. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos*. 2006.
44. Available from: <http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?data=24/04/2006&jornal=1&pagina=101&totalArquivos=128> (accessed 3 May 2013).
45. Committee for Medicinal Products for Human Use. *Guideline on the investigation of Bioequivalence*. European Medicines Agency. 2010. Available from: http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf (accessed 2 May 2013).
46. US Food and Drug Administration. *Guidance for Industry: Statistical Approaches to Establishing Bioequivalence*. 2001. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070244.pdf> (accessed 2 May 2013).