

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO BIOANALÍTICO POR CLAE-EM/EM PARA QUANTIFICAÇÃO DO ANTIPSICÓTICO OLANZAPINA EM PLASMA HUMANO.

Atamai Sertão Lopes de Oliveira¹; Danilo César Galindo Bedor².

¹Estudante do Curso de farmácia- CCS – UFPE; E-mail: atamai@live.com, Docente do ²Departamento de Farmácia– CCS – UFPE. E-mail: danilo.bedor@nudfac.com.br.

Sumário: Tem se notado um maior interesse pelo desenvolvimento de métodos analíticos eficazes que assegurem o controle de qualidade para fármacos. Baseando-se neste fato, este trabalho visou desenvolver uma metodologia analítica para quantificação da olanzapina, um fármaco antipsicótico de grande relevância na terapêutica por cromatografia de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas. Para tanto foi pesquisado na literatura as características físico-químicas do fármaco, e com posse desses dados foi realizada a recuperação do fármaco do plasma humano, e em seguida estabelecida as condições espectrométricas e os parâmetros cromatográficos de otimização da hifenação (CLAE-EM/EM). O solvente MTBE e o pH 9,4 produziram uma maior recuperação e maior eficácia no processo de extração. Os tempos de retenção OLZ/VLX foram respectivamente 4,2 min/ 3,1 min, com tempo de análise de 6,5 minutos. Na Espectrometria de massas foram observados picos correspondentes as massas da OLZ/VLX de 313,167/ 278,184 respectivamente, equivalentes com as massas de suas moléculas protonadas. O método demonstrou ser eficaz quanto aos parâmetros analisados. Os resultados deste trabalho tornaram-se importantes no controle de qualidade da Olanzapina.

Palavras-chave: bioanalítico; CLAE-EM/EM; olanzapina

INTRODUÇÃO

A Esquizofrenia segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) afeta mais de 21 milhões de pessoas em todo o mundo, cerca de 1% da população em geral, normalmente acomete jovens de 15 a 35 anos, causando-lhes sintomas incapacitantes que afetam o modo de se portar e interagir com outras pessoas. (RANG et al., 2012). Para o tratamento da esquizofrenia a Olanzapina é um dos antipsicóticos mais prescritos no Brasil e em todo o mundo. (ESTHER et al., 2010). A mesma foi sintetizada em 1982, pela indústria inglesa Eli Lilly a partir da clozapina (BRASIL, 2015). Pertence ao grupo dos tienobenzodiazepínicos, atua sobre o sistema nervoso central, causando melhorias nos pacientes com esquizofrenia, mania transtornos bipolares e transtorno de personalidade limítrofe. (RÊGO et al., 2010). No Brasil, foi o terceiro fármaco de maior impacto financeiro padronizado no Componente Especializado da Assistência Farmacêutica em relação ao total financiado pelo SUS, em 2012/2013 (BRASIL, 2014). O Desenvolvimento do método bioanalítico é de suma importância, principalmente no que concebe o isolamento e quantificação do fármaco na matriz biológica, visto que esta é muito complexa, para se ter um método que garanta este isolamento são necessárias técnicas de alta seletividade e exatidão. (BEDOR, 2007). O método utilizado para o doseamento foi a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Esta apresenta uma alta sensibilidade e alta seletividade que são as características ideais para a bioanálise. Desta forma O objetivo deste trabalho é desenvolver um método de quantificação da Olanzapina

em plasma humano, utilizando a técnica CLAE-EM/EM, garantindo boa seletividade e boa sensibilidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Objetivando estabelecer especificações para o controle de qualidade da olanzapina realizou-se um estudo comparativo com a substância química de referência da olanzapina (Lote, 01F0010611) utilizada na preparação dos padrões de calibração e nos controles de qualidade. O padrão interno utilizado a venlafaxina (08263/2005) teor 100,82% cedida pelo laboratório Cristália. A matriz biológica empregada neste estudo, o plasma humano, para o preparo das amostras de padrão de calibração e de controles de qualidade foram utilizadas amostras de plasma obtidas de colaboradores do NUDFAC (seis indivíduos diferentes, volume aproximado de 42 mL). Para este trabalho utilizou-se a técnica de extração líquido-líquido (ELL). As principais vantagens da ELL são as facilidades de operação manual, o relativo baixo custo e a boa aplicabilidade em amplo espectro de compostos, com extratos limpos, boa recuperação e boa reprodutibilidade. (BEDOR, 2007; ORLANDO et al., 2009). Três diferentes tipos de amostras foram utilizadas durante o desenvolvimento do processo de extração: 1) amostras de plasma fortificadas, preparadas através da adição de 10 uL da solução padrão em 90 uL de plasma, obtendo assim amostras contendo 5 ng/mL; 2) amostras de plasma “branco”, obtidas através da adição de 10 uL de acetonitrila em 90 uL de plasma; 3) soluções padrões, preparadas adicionando-se 10 uL da solução padrão em 90 uL de acetonitrila. O plasma utilizado no preparo dessas amostras foi obtido da seguinte forma: Amostras de sangue foram coletadas de voluntários do NUDFAC utilizando-se tubos contendo EDTA. Em seguida, foram centrifugadas por 5 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para um tubo Falcon (15mL). Assim, um pool de plasma foi obtido. Após a realização dos testes constatou-se que a utilização de MTBE como solvente extrator aliado a um pH alcalino (9,4), produz um menor efeito matriz e uma maior recuperação e eficiência do processo para extração da OLZ. Após a extração, as amostras foram submetidas à otimização da separação utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A fase móvel utilizada para eluir a amostra e a coluna cromatográfica foram escolhidas de acordo com a resposta, com tempo de retenção acima do volume morto do sistema. O objetivo principal da separação cromatográfica foi o de obter uma retenção do analito que demonstre seletividade e sensibilidade. Após a separação pela CLAE, a amostra foi introduzida no espectrômetro de massas, onde foram testados diferentes modos de ionização (*Electrospray* e Ionização Química à Pressão Atmosférica - APCI). Foram otimizados parâmetros de operação do equipamento, tais como a diferença de voltagem entre o cone e o capilar, a energia de colisão, vazão de nitrogênio, resoluções dos quadrupolos (*Tune page*) e a pressão do gás de colisão (Argônio) para cada um dos compostos a serem analisados (analito e seu padrão interno).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os volumes de preparo das amostras foram

pH	Concentração (mol L ⁻¹)	Alíquota da solução A (uL)	Alíquota da solução B (uL)	Volume final (mL)
2,7	0,1	200	2000	10
3,7	0,1	200	200	10
4,7	0,1	200	20	10

As condições cromatográficas do método bioanalítico foram:

Descrição	Especificação
Coluna cromatográfica	Kinetex HILIC 100 x 2,1 mm, 2,6 µm – Phenomenex
Pré-coluna	Gemini NX C18 4 x 3,0 mm – Phenomenex
Temperatura da coluna	T.A
Fase móvel	85,5% ACN + 14,5% tampão de formato de amônio 15 mM, pH 4,7.
Fluxo da fase móvel	0,2 mL/min
Pressão típica da coluna	180 Kgf/cm ²
Volume de injeção	5µL
Temperatura do autoinjeter	4° C
Tempo de retenção OLZ/VLX	4,2 min/ 3,1 min
Tempo de análise	6,5 minutos

As Condições espectrométricas foram:

Descrição	Especificação
Modo de ionização	ESI +
Voltagem do capilar (kV)	2231
Temperatura de desolvatação (°C)	750
Gás de desolvatação (GS1)	35
Gás de secagem (GS2)	35,2
Gás do cone de amostragem (CUR)	23,7
Gás de colisão (CAD)*	3

O método utilizou-se da técnica CLAE-EM/EM, o padrão interno selecionado, a Venlafaxina, a matriz biológica: o plasma humano coletado para um tubo de polipropileno. A extração foi do tipo Líquido-líquido, a quantificação, realizada através da resposta do equipamento, obtida pela razão entre a área do pico cromatográfico do analito e a área do pico do padrão interno. O intervalo de linearidade estudado foi de 50 a 20.000 ng/mL. Portanto evidenciou-se um método seletivo e sensível.

CONCLUSÕES

Ao término do trabalho verificou-se que método de extração líquido-líquido mostrou-se simples e eficaz. com utilização de solvente e pH adequado extraiu o analito da matriz de forma satisfatória. A metodologia CLAE-EM/EM mostrou-se eficiente, no que diz respeito a seletividade foi evidenciada uma total separação entre o composto OLZ e o Padrão VLX. E no que diz respeito a sensibilidade também pois apresentou um baixo limite de quantificação. Portanto o método mostrou-se válido para quantificação e controle da OLZ em plasma humano.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador, **Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor** pela e ao mestrando Daniel da Mota Castelo Branco pela oportunidade e atenção, aos colegas de laboratório pela experiência e ensinamentos fornecidos e ao **CNPq** pela possibilidade da realização da iniciação científica.

REFERÊNCIAS

BEDOR, D. C. G. 2007. *Desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos para dosagem de antimicrobianos em plasma humano*. Universidade Federal de Pernambuco.

BRASIL 2014. Componente Especializado Da Assistência Farmacêutica: Inovação para a garantia do acesso a medicamentos no SUS. Ministério Da Saúde.

BRASIL. Acessado em agosto de 2015. *Empresa Eli Lilly* https://www.lilly.com.br/Inserts/Patients/Bula_Zyprexa_Zydis_Paciente_CDS24SET12.df

ESTHER, M. et al. 2010. Olanzapine affects locomotor activity and meal size in male rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 97: 130–137.

ORLANDO, R. M., CORDEIRO, D. D., MATHIAS, A. E. B., REZENDE, K. R., GIL, E. D. S. Pré-tratamento de amostras. *Universidade de Campinas*, 2009

RANG, H. P. et al. 2012. *Rang e Dale Farmacologia 7ª edição*. Editora Elsevier. São Paulo.

RÊGO, J.F.; MOURA, J.I.; MOITA, G.C 2010. Determinação de olanzapina em formulações farmacêuticas por espectrofotometria: desenvolvimento e validação. *Química Nova*, v.33, n.2, p.471-477.