

Análise simultânea da mirtazapina e N-desmetilmirtazapina em plasma empregando a cromatografia líquida de alta eficiência

Ana Cecília Coragem Briguenti, Pierina Sueli Bonato*

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Para avaliação das propriedades farmacocinéticas e monitorização terapêutica da mirtazapina, antidepressivo recentemente introduzido no mercado e que vem sendo bastante utilizado, são necessários métodos de análise simples, sensíveis e seletivos. Sendo assim, a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência foi empregada para o desenvolvimento de um método para análise simultânea da mirtazapina e de seu metabólito, N-desmetilmirtazapina, em plasma. Após extração líquido-líquido utilizando tolueno como solvente extrator, o fármaco, metabólito e padrão interno (metoprolol) foram separados em coluna LiChrospher 100 RP-8 capeada, utilizando fase móvel composta por tampão fosfato de sódio, 0,1 mol/L, pH 3,5-acetonitrila (82:18, v/v). O método apresentou linearidade no intervalo de 2,5 a 500 ng/mL para ambos os compostos, com recuperações médias de 77 e 66% para a mirtazapina e demetilmirtazapina, respectivamente. Os limites de quantificação (2,5 ng/mL), precisão (CV < 15%) e exatidão (erros relativos < 15%) do método asseguram a sua aplicabilidade em estudos de disposição cinética e para o controle terapêutico da mirtazapina.

Unitermos

- Mirtazapina
- N-desmetilmirtazapina
- HPLC
- Plasma

*Correspondência:

P. S. Bonato
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
de Ribeirão Preto, Av. Café, SN
14040-903 - Ribeirão Preto - SP
Email: psbonato@fcrp.usp.br

INTRODUÇÃO

A mirtazapina (MTZ) é um novo antidepressivo, membro da classe das piperazinoazepinas, que possui modo de ação diferente de qualquer outro antidepressivo utilizado atualmente. A MTZ tem dupla ação, aumentando a atividade central noradrenérgica e serotoninérgica, através do bloqueio de receptores α_2 e do antagonismo seletivo de receptores 5HT₂ e 5HT₃. (Fawcett, Barkin, 1998; Nutt, 1997; Sussman, Stahal, 1996). Devido à sua meia-vida de eliminação, de 20 a 40 horas, a MTZ é admi-

nistrada em uma dose única diária que varia de 15 a 45 mg, resultando em concentrações plasmáticas de 5 a 100 ng/mL (Timmer, Ad Sitsen, Delbressine, 2000; Fawcett, Barkin, 1998).

O metabolismo da MTZ já foi estudado em várias espécies de animais, bem como em humanos (Sandker *et al.*, 1994). As principais vias do metabolismo da MTZ são a N-desmetilação, a N-oxidação e 8-hidroilação, seguidas de conjugação. A MTZ também sofre conjugação direta com uma glicoronida, formando um derivado amônio quaternário (N⁺) (Caccia, 1998; Timmer, Ad Sitsen,

Delbressine, 2000). As estruturas da MTZ e do metabólito encontrado no plasma, *N*-desmetilmirtazapina (DMTZ) são mostradas na Figura 1.

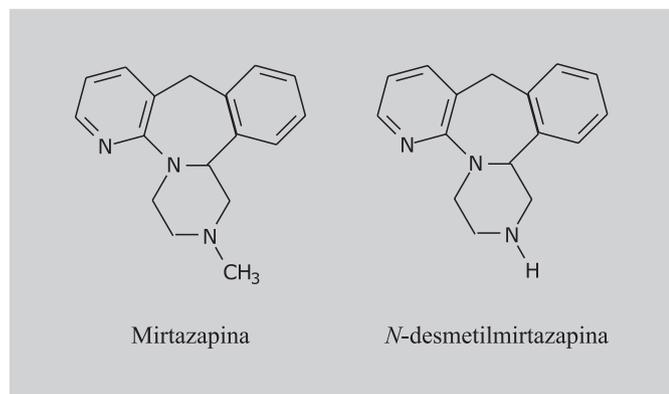


FIGURA 1- Estrutura da mirtazapina e *N*-desmetilmirtazapina.

O metabólito ativo da MTZ é a *N*-desmetilmirtazapina (DMTZ), que apresenta atividade farmacológica de 5 a 10 vezes menor (Timmer, Ad Sitsen, Delbressine, 2000) e se acumula nos tratamentos crônicos, atingindo concentrações plasmáticas próximas à da MTZ (Shams, Hiemke, Härtter, 2004).

A análise da MTZ em plasma tem sido feita empregando, principalmente, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Ptáek, Klíma e Macek (2003) validaram um método para análise da MTZ em plasma com um baixo limite de quantificação (1,5 ng/mL), entretanto, o método não foi validado para análise simultânea do metabólito. Outro método descrito na literatura emprega um detector por absorção no UV, HPLC em fase reversa e extração em fase sólida para a análise da MTZ e de outros antidepressivos e antipsicóticos, com limite de quantificação de 5 ng/mL (Frahner, Rao, Crasmäder, 2003).

A análise simultânea da MTZ e DMTZ foi relatada por Romiguières *et al.* (2002), empregando HPLC com fase reversa e um detector por absorção no UV, mas com limite de detecção de 20 ng/mL de plasma. Maris; Dingler; Niehues (1999) descreveram um método bastante sensível (limite de quantificação de 0,5 ng/mL), empregando detector por fluorescência, para análise simultânea da MTZ e DMTZ. Entretanto, a necessidade de utilização de eluição por gradiente e extração líquido-líquido em duas etapas, tornam esse método demorado e complicado para aplicações em análises de rotina.

O método descrito por Shams, Hiemke e Härtter (2004) para a análise simultânea da MTZ e DMTZ permitiu a análise direta das amostras de plasma, através de um sistema de comutação de colunas e apresentou limite de quantificação de 10 ng/mL para a MTZ e 5 ng/mL para o

metabólito. Morgan, Tapper e Spencer (2003) publicaram um método para a análise da MTZ e DMTZ no qual é empregada a extração líquido-líquido com pequenas quantidades de plasma (200 µL). O método é bastante sensível, apresentando limite de quantificação de 1 ng/mL para ambos os analitos e faixa ampla de linearidade (4 – 1000 ng/mL). No entanto, requer o uso de uma coluna de sílica modificada com grupos sulfopropil, pouco comum na maioria dos laboratórios que atua na análise de fármacos.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar um novo método para análise e quantificação da mirtazapina e seu principal metabólito, a DMTZ, em plasma, visando à sua aplicação futura em estudos de disposição cinética e monitorização terapêutica.

MATERIAL E MÉTODOS

Soluções-padrão, solventes e reagentes

As soluções-padrão de MTZ e DMTZ, gentilmente cedidas pela N. V. Organon (Oss, Holanda), foram preparadas em metanol (grau cromatografia, Merck, Darmstadt, Alemanha), na concentração de 1 mg/mL. A partir destas soluções foram preparadas diluições nas concentrações de 0,1 a 20 µg/mL. Todas as soluções foram armazenadas a -20 °C, na ausência da luz. As soluções dos fármacos avaliados como padrão interno (metoprolol, Astrazeneca, Cotia, SP, Brasil, 50 µg/mL) e interferentes do método (Tabela III, 1,0 mg/mL) também foram preparadas em metanol.

A solução tampão fosfato de sódio usada na preparação da fase móvel foi preparada com água purificada no sistema Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, MA, EUA), ácido fosfórico e hidróxido de sódio (grau p.a., Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A acetonitrila grau cromatografia utilizada foi obtida da Mallinckrodt (Paris, KY, EUA) e J. T. Baker (Xalostoc, México). No procedimento de extração da amostra foi utilizado cloreto de sódio (grau p.a.) e tolueno (grau cromatografia) obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Equipamento

Foi empregado um cromatógrafo SHIMADZU (Kyoto, Japão), constituído por uma bomba modelo LC10AS, um injetor Rheodyne modelo 7125 com amostrador de 50 µL e um integrador modelo C-R6A. Para detecção do fármaco e metabólito empregou-se um detector por fluorescência FD-500 (Groton Technologies Inc., Concord, MA, EUA) com comprimento de onda de excitação e emissão em 290 nm e 350 nm, respectivamente, e frequência de 60 Hz.

A análise cromatográfica foi conduzida em uma coluna LiChrospher 100 RP-8 capeada (4,6 x 150 µm, 5 mm), protegida por uma coluna de guarda do tipo CN LiChrospher 100 (4 x 4 mm, 5 µm), provenientes da Merck (Darmstadt, Alemanha). A fase móvel empregada consistia de tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 3,5-acetonitrila (82:18, v/v).

Preparação das amostras

Aliquotas de 1 mL de plasma foram adicionadas de 25 µL da solução do padrão interno, 500 mg de NaCl e alcalinizadas com 25 µL de NaOH 0,5 mol/L. As amostras foram agitadas em “mixer” durante 20 segundos e, após repouso por 15 minutos, foram extraídas com 4 mL de tolueno (agitação horizontal por 30 minutos). Após centrifugação a 1800 x g durante 5 minutos, as fases orgânicas foram separadas e evaporadas a securo sob fluxo de ar comprimido. Os resíduos foram dissolvidos em 80 µL de fase móvel e 50 µL foram cromatografados.

Validação do método de análise

Para avaliação da linearidade, 25 µL das soluções-padrão de MTZ e DMTZ foram adicionadas a 1 mL de plasma de modo a obter concentrações de 2,5, 5, 20, 50, 100, 250 e 500 ng/mL de plasma (n = 2 para cada concentração). Em seguida, as amostras de plasma foram adicionadas de 25 µL de solução do padrão interno na concentração de 50 µg/mL e submetidas ao procedimento de extração e análise. A linha de regressão foi obtida plotando as concentrações no eixo das abcissas e a razão das alturas dos picos (pico do fármaco/pico do PI) no eixo das ordenadas.

Para avaliar a recuperação absoluta, amostras de plasma fortificadas com MTZ e DMTZ nas concentrações de 5, 20, 50 e 250 ng/mL (n = 3 para cada concentração) foram submetidas ao processo de extração. As fases orgânicas obtidas foram adicionadas do padrão interno, evaporadas a securo e, após os resíduos terem sido dissolvidos na fase móvel, efetuou-se a análise cromatográfica. As concentrações dessas amostras foram calculadas empregando uma curva analítica, obtida pela análise direta do fármaco, metabólito e padrão interno na fase móvel.

A exatidão e precisão foram verificadas através de estudos interensaios e intra-ensaio. Foram preparadas amostras de plasma contendo concentrações conhecidas de MTZ e DMTZ (7,5, 100 e 400 ng/mL). Na avaliação da precisão e exatidão intra-ensaio, replicatas (n=5) das amostras de plasma fortificadas foram analisadas em um mesmo dia. Para a precisão e exatidão interensaios, foram

considerados os resultados das análises realizadas em quatro dias consecutivos, em triplicata, para cada concentração. As concentrações de MTZ e DMTZ nessas amostras foram determinadas empregando curvas analíticas preparadas diariamente.

O limite de quantificação foi determinado por meio da análise de amostras de plasma (n=5) contendo concentrações decrescentes da mirtazapina e seu metabólito até o menor nível quantificável, com coeficientes de variação e erro relativo menores que 20%.

A seletividade do método foi avaliada através da análise de 25 µL de soluções-padrão de diversos fármacos na concentração de 1 mg/mL, após secagem sob fluxo de ar e dissolução em 80 µL de fase móvel. Análises de amostras de plasma branco também foram feitas para verificar a interferência de compostos endógenos.

Aplicação do método

Para verificar a eficácia e aplicabilidade do método desenvolvido, foi realizada a análise de uma amostra obtida de um paciente adulto (40 anos, 62 kg, sexo feminino) sob tratamento com MTZ (30 mg/dia). Dez horas após administração da dose diária de MTZ foi efetuada a coleta de 5 mL de sangue, em tubo heparinizado. Após centrifugação a 1800 x g, durante 5 minutos, o plasma foi separado e estocado a -20 °C, até o momento da análise (estudo aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, 19-CEP/FCFRP).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Otimização das condições

Exceto pelo método descrito por Morgan; Tapper; Spencer (2003), a separação da MTZ e DMTZ tem sido feita normalmente empregando colunas de fase reversa. Assim, empregamos uma coluna RP-8 que permitiu a separação do fármaco, metabólito e padrão interno em menos de 13 minutos. Os picos ligeiramente alargados, principalmente da MTZ, acontecem devido às interações secundárias entre os compostos básicos analisados e os grupos silanóis residuais presentes na fase estacionária. Esse maior alargamento dos picos não resultou em prejuízos significativos na sensibilidade e seletividade do método. A coluna de guarda CN empregada, por ser de tamanho reduzido (4 x 4 mm), não afeta significativamente a separação. A MTZ apresenta caráter básico, com pKa de 7,1 (Kelder *et al.*, 1997) e, portanto, a extração foi feita em meio básico. A adição de 500 mg de NaCl teve influência apenas na extração do

metabólito, uma substância de caráter mais polar que a MTZ. O método de extração mostrou-se simples e capaz de extrair a MTZ e DMTZ eficientemente e eliminar interferentes do plasma. A Figura 2A mostra o cromatograma referente a um plasma branco.

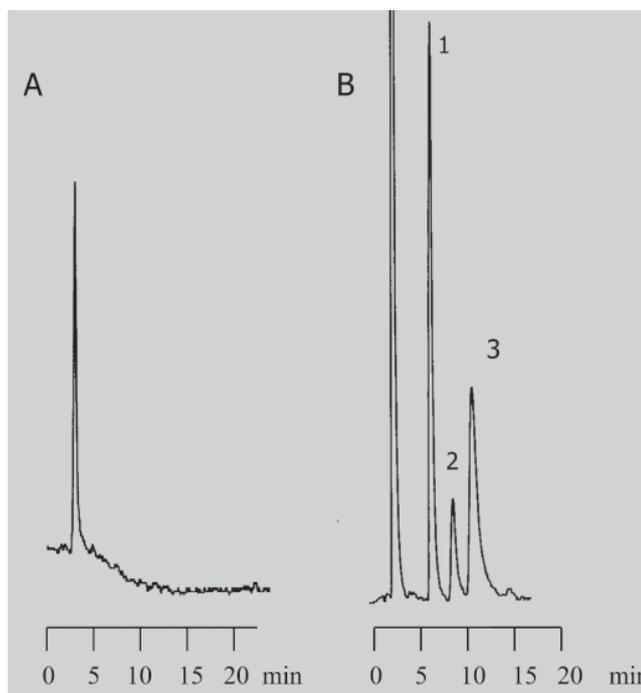


FIGURA 2- Cromatogramas referentes a análise de MTZ e DMTZ em plasma. (A) Branco de plasma; (B) Amostra coletada 10 horas após administração de MTZ. Metoprolol (1); DMTZ (2); MTZ (3).

Validação do método

O principal objetivo da validação de um procedimento analítico é demonstrar que ele é adequado aos seus propósitos. Para tanto, são adotados critérios que seguem normas de órgãos nacionais como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e internacionais como o Food and Drug Administration (FDA, 2000).

A linearidade de um método é a sua habilidade de produzir resultados que são diretamente, ou por transformação matemática bem definida, proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de um certo intervalo (Causon, 1997). Para verificar a linearidade de um método é construída uma curva analítica com amostras extraídas da matriz apropriada em, no mínimo, 6 concentrações diferentes. Para avaliar os resultados, é utilizado o cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, sendo necessário obter alto coeficiente de correlação ($r > 0,99$) e desvio do valor nominal menor ou igual a 15% (ANVISA, 2003). Neste trabalho foi empregada a faixa

de 2,5 a 500 ng/mL de plasma com 7 concentrações diferentes. Curvas analíticas típicas que demonstram a linearidade do método são descritas na Tabela I.

A recuperação reflete a quantidade do analito recuperada durante um processo de extração em relação à quantidade real presente na amostra. A recuperação foi avaliada calculando-se a concentração de amostras submetidas ao processo de extração, com base em uma curva analítica preparada a partir da injeção direta de soluções-padrão dos fármacos na fase móvel. A Tabela I mostra os resultados de recuperação para as quatro concentrações analisadas.

TABELA I - Recuperação e linearidade do método de análise da MTZ e DMTZ

Parâmetro	MTZ	DMTZ
Linearidade		
Intervalo (ng/mL)	2,5-500	2,5-500
Coefficiente angular	0,0068	0,0052
Coefficiente linear	-0,030	-0,016
Coefficiente de correlação	0,997	0,994
Recuperação (%)		
5 ng/mL	77,4	68,7
20 ng/mL	73,2	62,8
50 ng/mL	74,1	64,2
250 ng/mL	84,5	69,4
Media	77,3	66,3
CV (%)	5,8	4,2

CV, Coeficiente de variação

A precisão e exatidão determinam o erro de uma análise e são os critérios mais importantes para o julgamento do desempenho de um método analítico. A precisão reflete a variação dos resultados quando repetidas análises são feitas em uma mesma amostra. O valor numérico usado é o coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo e deve ser menor que 15% (Bressole, Bromet-petit, Audran, 1996). Quando a análise das amostras controle é realizada no mesmo ensaio (ou no mesmo dia), os dados obtidos são expressos como precisão intra-ensaio. Análises feitas em dias diferentes são expressas como precisão interensaios. Exatidão é a concordância entre o valor real da substância na amostra e o estimado pelo processo analítico. É expressa em porcentagem do erro relativo, que deve ser inferior a 15% (Causon, 1997).

A Tabela II mostra os resultados obtidos nos estudos de precisão e exatidão, comprovando que o método atinge os critérios acima.

O limite de quantificação é a menor concentração do analito de interesse quantificada com precisão e exatidão

TABELA II - Precisão e exatidão do método de análise de MTZ e DMTZ

	MTZ			DMTZ		
	400	100	7,5	400	100	7,5
Concentração real (ng/mL)	400	100	7,5	400	100	7,5
Interensaios (n = 4)						
Concentração média	383,0	90,9	6,5	418,2	93,9	6,4
C V (%)	5,5	8,2	1,0	4,6	2,9	7,4
Exatidão (%)	-4,3	-9,1	-12,8	4,6	-6,0	-14,8
Intra-ensaio (n = 5)						
Concentração média	415,4	89,3	6,6	423,3	92,6	6,5
C V (%)	6,5	7,0	9,3	7,8	7,6	7,7
Exatidão (%)	3,9	-10,7	-11,7	5,8	-7,4	-13,8

CV, coeficiente de variação; n, número de determinações.

aceitáveis nas condições experimentais determinadas, ou seja, com coeficientes de variação e erros relativos inferiores a 20% (Causon, 1997). Através da análise de amostras de plasma fortificadas com concentrações decrescentes de MTZ e DMTZ (2,5 e 1,0 ng/mL), foi determinado como limite de quantificação a concentração de 2,5 ng/mL para ambos os analitos. Nesta concentração foram encontrados valores de precisão e exatidão de 11,4% e 15,0%, respectivamente, para a MTZ e 9,0% e 18,4% para a DMTZ. Esse limite de quantificação, embora superior aos valores relatados por alguns autores na literatura (Ptáek, Klíma, Macek, 2003; Maris, Dingler, Niehues, 1999; Morgan, Tapper, Spencer, 2003), é adequado para utiliza-

TABELA III - Fármacos avaliados quanto à interferência no método

Fármaco	t _R (min)	Fármaco	t _R (min)
Atenolol	nd	Fenitoína	nd
Amitriptilina	nd	Flunitrazepam	17
Bromazepam	7,7	Fluoxetina	nd
Cafeína	nd	Imipramina	nd
Carbamazepina	nd	Levopromazina	nd
Cimetidina	17	Mexiletina	9,2
Clobazam	nd	Omeprazol	4
Clormezanona	nd	Pindolol	4,4
Clorpromazina	nd	Primidona	nd
Disopiramida	nd	Propranolol	nd
Diazepam	nd	Salbutamol	1,8
Diltiazem	nd	Tioridazina	nd
Dipirona	nd	Verapamil	nd

t_R, tempo de retenção; nd, não detectado em 30 minutos de análise; tempos de retenção da MTZ = 11,7 min, DMTZ = 9,6 min e metoprolol = 5,8 min.

ção do método em estudos de disposição cinética (Dahl *et al.*, 1997).

A seletividade é a habilidade de um método de separar o analito de metabólitos, compostos endógenos e fármacos co-administrados (Bressole; Bromet-Petit; Audran, 1996). Para avaliar a seletividade do método foram feitas injeções de 25 µL de soluções-padrão na concentração de 1 mg/mL de diversos fármacos utilizados no tratamento de hipertensão, como anticonvulsivantes e medicamentos de venda livre, entre outros. A Tabela III mostra os medicamentos analisados no estudo de interferência.

Dentre os 26 fármacos analisados apenas 7 foram detectados e, destes, apenas a mexiletina apresentou tempo de retenção semelhante ao da DMTZ, embora o pico obtido tenha sido bastante pequeno, não sendo detectada em sua concentração terapêutica máxima. Bromazepam e pindolol que eluem próximos à DMTZ e PI, respectivamente, também não interferem no método.

Aplicação do método

Para verificar a eficácia e aplicabilidade do método desenvolvido, foi analisada uma amostra de plasma obtida de um voluntário aproximadamente 10 horas após a administração de 30 mg de MTZ, preparada de acordo com o procedimento já descrito. A Figura 2B mostra o resultado dessa análise. As concentrações obtidas para a MTZ e DMTZ foram 38,0 ng/mL e 14,2 ng/mL, respectivamente.

CONCLUSÕES

Neste trabalho foram apresentados os resultados obtidos no desenvolvimento e validação de um método para análise da MTZ e seu metabólito ativo, a DMTZ. O

método, empregando uma coluna RP-8 e extração líquido-líquido, mostrou-se simples, rápido, preciso e com limite de quantificação e faixa de linearidade adequados para a análise da MTZ e seu metabólito em plasma.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas.

ABSTRACT

Simultaneous analysis of mirtazapine and N-demethylmirtazapine in plasma by high-performance liquid chromatography

Simple, sensitive and selective analytical methods are required for pharmacokinetic studies and therapeutic drug monitoring of mirtazapine, a new antidepressant drug. Thus high-performance liquid chromatography with fluorescence detection was used for the simultaneous analysis of mirtazapine and its metabolite, N-demethylmirtazapine, in plasma. After liquid-liquid extraction with toluene, the drug, metabolite and internal standard (metoprolol) were resolved using a LiChrospher 100 RP-8 endcapped column with a mobile phase of 0.1 mol/L phosphate buffer, pH 3.5-acetonitrile (82:18, v/v). The method was linear in the range of 2.5 to 500 ng/mL for both analytes, with mean recoveries of 77% and 66% for mirtazapine and N-demethylmirtazapine, respectively. The quantification limits (2.5 ng/mL), precision (CV < 15%) and accuracy (relative errors < 15%) indicate the method is suitable for pharmacokinetic studies and therapeutic drug monitoring.

UNITERMS: Mirtazapine. N-demethylmirtazapine. HPLC. Plasma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20 jul. 2004.
- BRESSOLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: applications to pharmacokinetics. *J. Chromatogr. B*, v. 686, p. 3-10, 1996.
- CACCIA, S. Metabolism of the newer antidepressants – An overview of the pharmacological and pharmacokinetic implications. *Clin. Pharmacokinet.* v. 34, p. 281-302, 1998.
- CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. *J. Chromatogr. B*, v. 689, p.175-180, 1997.
- DAHL, M.-L.; VOORTMAN, G.; ALM, C.; ELWIN C.-E., DELBRESSINE, L.; VOS, R.; BOGAARDS, J.J.P.; BERTILSSON, L. In vitro and in vivo studies on the disposition of mirtazapine in humans. *Clin. Drug Invest.*, v. 13, p. 37-46, 1997.
- FAWCETT, J; BARKIN, R. L. Review of the results from clinical studies on the efficacy, safety and tolerability of mirtazapine for the treatment of patients with major depression. *J. Affect. Disord.*, v. 51, p. 267-285, 1998.
- FDA. Guidance for industry – Analytical procedures and methods validation. Disponível em: <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>. Acesso em: 20 jul. 2004.
- FRAHNERT, C.; RAO, M. L.; GRASMÄDER, K. Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for drug monitoring. *J. Chromatogr. B*, v. 794, p. 35-47, 2003.
- KELDER, J; FUNKE, C.; DE BOER, T.; DELBRESSINE, L.; LEYSEN, D.; NICKOLSON, V. A comparison of the physicochemical and biological properties of mirtazapine and mianserin. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 49, p. 403-411, 1997.
- MARIS, F. A., DINGLER, E., NIEHUES, S. High-performance liquid chromatography assay with fluorescence detection for the routine monitoring of the antidepressant mirtazapine and its demethyl metabolite in human plasma. *J. Chromatogr. B*, v. 721, p. 309-316, 1999.
- MORGAN, P. E.; TAPPER, J., SPENCER, E. P. Measurement of total mirtazapine and normirtazapine in plasma/serum by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, v. 798, p. 211-215, 2003.
- NUTT, D. Mirtazapine: pharmacology in relation to adverse effects. *Acta Psychiatr. Scand.*, v. 96, supp. 391, p. 31-37, 1997.

- PTÁEK, P.; KLÍMA, J.; MACEK, J. Determination of mirtazapine in human plasma by liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, v. 794, p. 323-328, 2003.
- ROMIGUIERES, T.; PEHOURCQ, F.; MATOGA, M.; BEGAUD, B.; JARRY, C. Determination of mirtazapine and its demethyl metabolite in plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Application to management of acute intoxication. *J. Chromatogr. B*, v. 775, p. 163-168, 2002.
- SANDKER, G. W.; VOS, R. M. E.; DELBRESSINE, L. P. C.; SLOOFF, M. J. H.; MEIJER, D. K. F.; GROOTHUIS, G. M. M. Metabolism of three pharmacologically active drugs in isolated human and rat hepatocytes: analysis of interspecies variability and comparison with metabolism in vivo. *Xenobiotica*, v. 24, p. 143-155, 1994.
- SHAMS, M. Therapeutic drug monitoring of the antidepressant mirtazapine and its N-demethylated metabolite in human serum. *Ther. Drug Monit.*, v. 26, p. 78-84, 2004.
- SUSSMAN, N.; STAHL, S. Update in the pharmacotherapy of depression. *Am. J. Med.*, v. 101, suppl 6a, p. 26S-36S, 1996.
- TIMMER, C. J.; AD SITSSEN, J.M.; DELBRESSINE, L. P. Clinical pharmacokinetics of mirtazapine. *Clin. Pharmacokinet.*, v. 38, p. 461-474, 2000.

Recebido para publicação em 29 de julho de 2004.

Aceito para publicação em 07 de outubro de 2005.

