



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Determinação de antidepressivos em plasma humano por cromatografia líquida de rápida resolução acoplada a um detector de fotodiodos (UPLC-DAD)

Ana Isabel Afonso Neto

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas
(Ciclo de Estudos Integrado)

Orientadora: Prof^a. Doutora Maria Eugénia Gallardo Alba

Covilhã, Junho de 2011

Trabalho experimental efectuado no Centro de
Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da
Beira Interior.

*“Quer possas, quer sonhes que podes fazê-lo,
Começa-o!
A audácia tem génio, força e magia em si.”*

Goethe

Dedicatória

Dedico este trabalho...

À Professora Doutora Eugénia Gallardo por ter acreditado em mim desde o primeiro esboço deste projecto e pela força que me transmitiu ao longo deste tempo.

Aos meus pais, por me tornarem um ser humano mais completo e feliz a cada dia que passa, e por me incentivarem a que amanhã eu continue, fielmente, a perseguir aquilo em que acredito.

Ao Lino por todos os momentos e palavras que me ajudaram a ultrapassar as adversidades que se impuseram neste percurso.

Agradecimentos

À Universidade da Beira Interior e à Faculdade de Ciências da Saúde, pelo crescimento que me proporcionou enquanto pessoa e futura Farmacêutica.

À minha orientadora, Professora Doutora Eugénia Gallardo, pela disponibilidade, partilha, orientação científica e, sobretudo, pela amizade que manifestou durante todo este período de trabalho. Sem a sua dedicação e palavras de incentivo tudo teria sido mais difícil.

Aos meus pais, por todo o amor e carinho que me dedicam permanentemente e por toda a força, espírito de persistência e optimismo que me inculcaram desde sempre.

À minha família, pela disponibilidade e atenção que me proporcionam, em particular aos meus padrinhos.

Ao Lino, pelo apoio incondicional, pelas palavras de incentivo, pela paciência e pela preocupação constante.

À Beatriz e ao Ivo, pela colaboração e ajuda que sempre manifestaram.

Aos meus amigos, pelas palavras sensatas que tiveram ao longo deste caminho.

E por último a todos os que, de alguma forma, me ensinaram algo e me fizeram sorrir em dias mais tristonhos.

Resumo

O consumo de medicamentos usados para o tratamento das depressões tem vindo a aumentar ao longo da última década. Segundo a *Intercontinental Medical Statistics Health (IMS Health)*, os antidepressivos, a terceira classe terapêutica mais utilizada a nível mundial, tiveram em 2000 um aumento de 18%, representando 4,2% do mercado farmacêutico global.

Em Portugal, os dados publicados pelo Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (Infarmed) referem que o subgrupo farmacoterapêutico antidepressivos e psicotrópicos estava, em 2000, entre os 10 primeiros no que diz respeito aos encargos para o Serviço Nacional de Saúde (SNS) atingindo os 98 milhões de euros por ano. Por outro lado, o consumo destes medicamentos por parte da população não está totalmente controlado, já que para além dos problemas de automedicação é possível a sua aquisição através da Internet. Tal tem contribuído para o aumento dos casos de etiologia médico-legal suicida e para que os antidepressivos sejam considerados o segundo grupo de substâncias mais pesquisado na rotina laboratorial de toxicologia.

Assim sendo, advém a necessidade de elucidação de uma metodologia validada de forma a garantir que a mesma seja capaz de gerar informações confiáveis e interpretáveis.

Posto isto, o objectivo deste trabalho prende-se com a validação de uma metodologia analítica baseada na cromatografia líquida acoplada a um detector de *diode array* (UPLC/DAD) associada à extracção em fase sólida para a determinação de 9 antidepressivos (venlafaxina, trazodona, maprotilina, nortriptilina, fluoxetina, dotiepina, sertralina, amitriptilina e clomipramina) em plasma humano. Utilizando um volume de amostra de 500 μL , o método foi validado de acordo com as normas internacionalmente aceites para a validação de métodos bioanalíticos. Os parâmetros estudados foram a selectividade, especificidade, curva de calibração e linearidade, limite inferior de quantificação (LLOQ), limite de detecção (LOD), precisão, exactidão e recuperação.

O método demonstrou elevada sensibilidade, uma vez que, com a injeção no sistema cromatográfico de apenas 2 μL de amostra com antidepressivos, conseguiu visualizar-se resposta, traduzida pelos picos que surgiram no cromatograma.

O método foi selectivo, já que não foram detectados interferentes após análise de amostras brancas de plasma, tendo sido obtida uma resposta linear entre 0,1 - 5 $\mu\text{g/mL}$ para todos os antidepressivos, à excepção da sertralina, cujo intervalo de linearidade foi de 0,25 - 5 $\mu\text{g/mL}$. Os valores obtidos para a precisão e exactidão intra- e interdia estavam em conformidade com os critérios de validação mencionados, ou seja, coeficientes de variação inferiores a 15% e *BIAS* dentro de um intervalo de $\pm 15\%$ da concentração teórica (excepto no LLOQ, para o

qual foi considerado adequado o intervalo de $\pm 20\%$). Quanto à recuperação obtida, os valores oscilaram entre 72 - 95%.

Por último para avaliar a aplicabilidade da metodologia, esta foi aplicada a 3 casos de intoxicação hospitalar. Em conclusão, o método provou ser adequado para a determinação dos antidepressivos estudados em situações de intoxicação clínica ou forense.

Palavras-chave

Antidepressivos, monitorização, plasma e UPLC-DAD.

Abstract

The consumption of drugs used to treat depression has been increasing over the last decade. According to Intercontinental Medical Statistics Health (IMS Health), antidepressants, the third most used therapeutic class worldwide, had in 2000 an increase of 18%, representing 4.2% of global pharmaceutical market.

In Portugal, data published by the National Institute of Pharmacy and Medicine reported that the pharmacotherapeutic subgroup of antidepressants and psychotropics, was in 2000, in the top 10 with regard to costs for the National Health Service (NHS), reaching the 98 million Euro per year. On the other hand, the consumption of these drugs by the population is not fully controlled, and problems with self-medication exist; indeed, it is possible to purchase those drugs on the Internet. This has contributed to the increase in suicide cases, being antidepressants the second most encountered group of substances in routine toxicology laboratories.

Therefore, there is the need for the development of a validated methodology to ensure that it is able to generate reliable and interpretable information.

The aim of this work was the validation of an analytical methodology based on liquid chromatography coupled to a diode array detector (UPLC/DAD) associated with solid phase extraction for the determination of nine antidepressants (venlafaxine, trazodone, maprotiline, nortriptyline, fluoxetine, dothiepin, sertraline, clomipramine and amitriptyline) in human plasma. Using a sample volume of 500 μL , the method was validated according to internationally accepted standards for the validation of bioanalytical methods. The parameters studied were selectivity, specificity, calibration curve and linearity, lower limit of quantification (LLOQ), limit of detection (LOD), precision, accuracy and recovery.

The method demonstrated high sensitivity, since only 2 μL was injected in the chromatographic system.

The method was selective as no interferences were detected after analysis of blank samples of plasma, and a linear response was obtained between 0.1 and 5 $\mu\text{g/mL}$ for all antidepressants, except for sertraline (0.25 and 5 $\mu\text{g/mL}$). The values obtained for intra- and interday precision and accuracy were in agreement with the mentioned criteria, that is, coefficients of variation less than 15% and *BIAS* within a range of $\pm 15\%$ of theoretical concentration (except for LLOQ, for which $\pm 20\%$ was accepted). The recovery values ranged from 72 to 95%.

Finally to evaluate the applicability of the methodology, it was applied to three intoxication hospital cases. In conclusion, the method proved to be suitable for the determination of those antidepressants in clinical or forensic intoxication scenarios.

Keywords

Antidepressants, monitoring, plasma and UPLC-DAD.

Índice

Dedicatória	v
Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
Índice	xiii
Lista de figuras	xv
Lista de tabelas	xvii
Lista de gráficos	xix
Lista de acrónimos	xxi
Justificação do tema e objectivos	xxiii
Revisão da literatura	xxvii
1. Antidepressivos	1
1.1. Conceito de depressão	3
1.2. História: do 1º antidepressivo à terapêutica actual	4
1.3. Nova abordagem terapêutica	6
1.4. Classificação dos Antidepressivos	7
1.5. Fármacos seleccionados para a realização deste trabalho	8
1.6. Antidepressivos tricíclicos (TCA)	9
1.7. Inibidores selectivos da recaptação de serotonina (SSRI)	15
1.8. Inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (SNRI)	19
1.9. Inibidores da recaptação de serotonina/antagonistas dos receptores 2A de serotonina (SARI)	22
2. Monitorização terapêutica dos fármacos de estudo	24
3. Utilização de psicofármacos em Portugal	27
4. Determinação de antidepressivos em matrizes biológicas	28
4.1. Introdução à extracção em fase sólida (SPE)	28
5. Métodos para a quantificação de antidepressivos em plasma	31
Parte experimental	35
1. Material e métodos	37
1.1. Instrumentação	37
1.2. Reagentes e padrões analíticos	38
1.3. Padronização interna	39
1.4. Preparação de soluções	39
1.5. Matrizes biológicas	40
1.6. Procedimento de extracção	40
2. Resultados e discussão	41
2.1. Optimização do procedimento de extracção	41

2.2. Identificação das substâncias	44
2.3. Validação do método	47
3. Aplicação do método a amostras reais	61
Conclusões	63
Bibliografia	67
Anexos	75

Lista de figuras

Figura 1. Estrutura química da imipramina (A) e da isoniazida (B).	5
Figura 2. Características estruturais dos antidepressivos tricíclicos (TCA), tendo como modelo a molécula de imipramina.	10
Figura 3. Equivalentes usados nos esquemas seguintes.	29
Figura 4. Extração selectiva.	29
Figura 5. Lavagem selectiva.	29
Figura 6. Eluição selectiva.	30
Figura 7. As 5 etapas que envolvem o procedimento de extracção de fase sólida (SPE).	30
Figura 8. Cromatograma obtido para a clomipramina (C=1µg/mL).	44
Figura 9. Cromatograma obtido para a sertralina (C=1µg/mL).	45
Figura 10. Cromatograma obtido para a nortriptilina (C=1µg/mL).	45
Figura 11. Cromatograma obtido para a venlafaxina (C=1µg/mL).	45
Figura 12. Cromatograma obtido para a protriptilina (C=1µg/mL).	45
Figura 13. Cromatograma obtido para a fluoxetina (C=1µg/mL).	46
Figura 14. Cromatograma obtido para a dotiepina (C=1µg/mL).	46
Figura 15. Cromatograma obtido para a amitriptilina (C=1µg/mL).	46
Figura 16. Cromatograma obtido para a maprotilina (C=1µg/mL).	46
Figura 17. Cromatograma obtido para a trazodona (C=1µg/mL).	47
Figura 18. Cromatograma de amostra de plasma branco.	48
Figura 19. Cromatograma de amostra de plasma fortificada com os analitos em estudo (C = 1µg/mL).	49
Figura 20. Cromatograma correspondente à amostra 1 (A-nortriptilina; B-sertralina; C-amitriptilina).	62

Lista de tabelas

Tabela 1. Organização dos agentes antidepressivos em 3 classes principais tendo como base o presumível mecanismo de acção responsável pela sua eficácia.	8
Tabela 2. Estruturas químicas e características físico-químicas dos antidepressivos tricíclicos e tetracíclicos em estudo.	10
Tabela 3. Afinidade pelos receptores e potência dos antidepressivos cíclicos sobre o cérebro humano.	11
Tabela 4. Efeitos adversos comuns à classe de antidepressivos tricíclicos.	12
Tabela 5. Perfil dos efeitos adversos <i>major</i> para os antidepressivos cíclicos.	13
Tabela 6. Características farmacocinéticas dos antidepressivos cíclicos em estudo.	15
Tabela 7. Estruturas químicas e características físico-químicas dos inibidores selectivos da recaptação de serotonina em estudo.	16
Tabela 8. Efeitos adversos comuns à classe de inibidores selectivos da recaptação de serotonina.	17
Tabela 9. Perfil dos efeitos adversos <i>major</i> para os inibidores selectivos da recaptação de serotonina em estudo.	17
Tabela 10. Características farmacocinéticas dos inibidores selectivos da recaptação de serotonina em estudo.	19
Tabela 11. Estrutura química e características físico-químicas da venlafaxina.	20
Tabela 12. Características farmacocinéticas da venlafaxina.	21
Tabela 13. Estrutura química e características físico-químicas da trazodona.	22
Tabela 14. Características farmacocinéticas da trazodona.	23
Tabela 15. Intervalos-alvo com as respectivas concentrações plasmáticas dos fármacos a analisar.	25
Tabela 16. Doses terapêuticas, tóxicas e letais de diversos antidepressivos em estudo.	26
Tabela 17. Evolução dos encargos do Sistema Nacional de Saúde com antidepressivos entre 2000 e 2009.	27
Tabela 18. Métodos analíticos para a determinação dos antidepressivos em estudo em plasma.	32
Tabela 19. Descrição dos tempos de retenção de cada um dos antidepressivos em estudo.	44
Tabela 20. Tempo de retenção para alguns compostos que podem ser usados concomitantemente com antidepressivos.	49
Tabela 21. Dados para a avaliação da linearidade da maprotilina no 2º dia de validação.	52
Tabela 22. Dados para a avaliação da linearidade da maprotilina no 2º dia de validação com recurso à ponderação de 1/x.	53
Tabela 23. Dados de linearidade para os fármacos estudados (n=5).	53

Tabela 24. Precisão interdia e exactidão (n=5).	56
Tabela 25. Precisão intradia e exactidão (n=5).	56
Tabela 26. Resumo do limite inferior de quantificação para cada fármaco estudado (n=5).	59
Tabela 27. Valores para a recuperação obtidos com o método de extracção utilizado neste trabalho.	61
Tabela 28. Compostos identificados nas amostras reais e respectiva quantificação.	62

Lista de gráficos

Gráfico 1. Comparação da área de trazodona obtida em PBS e em plasma.	41
Gráfico 2. Comparação da área de maprotilina obtida em PBS e em plasma.	42
Gráfico 3. Comparação da área de nortriptilina obtida em PBS e em plasma.	42
Gráfico 4. Comparação da área de fluoxetina obtida em PBS e em plasma.	42
Gráfico 5. Comparação da área de dotiepina obtida em PBS e em plasma.	42
Gráfico 6. Comparação da área de sertralina obtida em PBS e em plasma.	43
Gráfico 7. Comparação da área de amitriptilina obtida em PBS e em plasma.	43
Gráfico 8. Comparação da área de clomipramina obtida em PBS e em plasma.	43

Lista de acrónimos

5-HT	Serotonina;
AD	Antidepressivos;
ALAT	<i>Alanine aminotransferase</i> - alanina aminotransferase;
ASAT	<i>Aspartate aminotransferase</i> - aspartato aminotransferase;
BD	Biodisponibilidade;
DA	Dopamina;
DSM-IV	Manual de Diagnóstico e Estatística das Perturbações Mentais;
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> ;
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> - cromatografia líquida de alta resolução;
Infarmed	Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento;
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> - extracção líquido-líquido;
LOD	<i>Lower Limit of Detection</i> - limite de detecção;
LLOQ	<i>Lower Limit of Quantification</i> - limite inferior de quantificação;
MAO	Monoamino-oxidase;
MAOI	<i>Monoamine oxidase inhibitors</i> - inibidores da monoamino-oxidase;
MAOI-A	<i>Selective monoamine oxidase type A inhibitors</i> - inibidores selectivos da monoamino-oxidase do tipo A;
mCPP	<i>meta-chloro-phenylpiperazine</i> - meta-cloro-fenilpiperazina;
MEPS	<i>Micro Extraction Packed Sorbent</i> - microextracção em seringa empacotada;
NA	Noradrenalina;
NARI	<i>Noradrenaline reuptake inhibitors</i> - inibidores da recaptação de noradrenalina;
NaSSA	<i>Noradrenergic and specific serotonergic antidepressant</i> - antidepressivos serotoninérgicos específicos e noradrenérgicos;
NT	Neurotransmissores;
ODV	O-desmetilvenlafaxina;
OMS	Organização Mundial de Saúde;
PBS	Tampão fosfato salino;
PNS	Plano Nacional de Saúde;
PP	Proteínas plasmáticas;
RIMA	<i>Reversible inhibitor of monoamine oxidase A</i> - inibidor reversível da monoamino-oxidase do tipo A;
SARI	<i>Serotonin antagonist and reuptake inhibitor</i> - inibidores da recaptação de serotonina/ antagonistas dos receptores 2A de serotonina;
SBSE	Extracção por absorção com barra de agitação;
SERT	<i>Serotonin transporter</i> - transportador de serotonina;
SNC	Sistema Nervoso Central;

SNRI	<i>Serotonin/noradrenaline reuptake inhibitors</i> - inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina;
SNS	Sistema Nacional de Saúde;
SPE	<i>Solid-Phase Extraction</i> - extracção de fase sólida;
SPME	<i>Solid-Phase Microextraction</i> - microextracção de fase sólida;
SSRI	<i>Selective serotonin reuptake inhibitors</i> - inibidores selectivos da recaptação de serotonina;
$T_{1/2}$	Tempo de semi-vida;
TDM	<i>Therapeutic Drug Monitoring</i> - monitorização terapêutica de fármacos;
TCA	<i>Tricyclic antidepressants</i> - antidepressivos tricíclicos;
Vd	Volume de distribuição.

**JUSTIFICAÇÃO DO TEMA
E OBJECTIVOS**

1. JUSTIFICAÇÃO DO TEMA

Cada vez mais se contextualiza a existência do Homem numa sociedade massiva, direccionada para objectivos materialistas. Neste sentido têm-se confrontado uma perda da harmonia de interesses em prol da desarmoniosa luta de classes, das pressões organizadas e da procura infundável da perfeição.

Como consequência a vida numa sociedade de massa cria insegurança e estimula a impotência, torna o Homem constrangido e ansioso; isola o indivíduo ao grupo sólido; destrói padrões de grupo firmes.

Em resposta à evolução do comportamento humano na sociedade actual emerge o conceito de depressão. De facto, a realidade traduz uma, cada vez mais, frequente sintomatologia da doença entre os indivíduos: tristeza perpetuada, perda de interesse por actividades habitualmente sentidas como agradáveis e perda de energia ou cansaço.

De acordo com o primeiro Estudo Epidemiológico Nacional de Saúde Mental - “Estudo Epidemiológico Nacional de Morbilidade Psiquiátrica: Prevalência, factores de risco, carga social e económica e utilização de serviços” - Portugal é o país da Europa com a maior prevalência de doenças mentais na população (estudo do Instituto Nacional de Farmácia e Medicamento - Infarmed).

Os dados do Portal da Saúde do Ministério da Saúde são prova confirmatória do atrás referido, sendo a depressão considerada condição médica que afecta 20% da população portuguesa. Esta é também a principal causa de incapacidade e a segunda causa de perda de anos de vida saudáveis entre as 107 doenças e problemas de saúde mais relevantes. Os custos pessoais e sociais da doença são muito elevados. Uma em cada quatro pessoas em todo o mundo sofre, sofreu ou vai sofrer de depressão. Um em cada cinco utentes dos cuidados de saúde primários portugueses encontra-se deprimido no momento da consulta.

Ter sentimentos depressivos é corrente, sobretudo após experiências ou situações que afectem o Ser Humano de forma negativa. Neste sentido aparecem os medicamentos usados no tratamento da depressão e que são denotados de antidepressivos. Estes são a pedra basilar no tratamento das depressões moderadas e graves bem como das depressões crónicas. Com a evolução da ciência e da farmacologia, estes medicamentos são cada vez mais eficazes no controlo e tratamento da patologia, nomeadamente por interferência com a acção de neurotransmissores, como a serotonina e a noradrenalina, no hipotálamo, a zona do cérebro responsável pelo humor (emoções).

Os dados são alarmistas no que concerne ao bem-estar do indivíduo, uma vez que, se trata de uma doença perturbadora. Além disso, os valores estimados de índole económica são

indicadores de que é necessária uma intervenção ao nível da monitorização terapêutica. Só assim será possível reduzir consumos desnecessários associados à terapêutica.

Assim, advém a necessidade de elucidação de uma técnica validada que permita fazer um controlo mais rigoroso dos níveis plasmáticos de tais fármacos. Com essa atitude interventiva será exequível conciliar o avanço no arsenal terapêutico com os objectivos de uma prática clínica de excelência.

2. OBJECTIVOS DA TESE:

1. Quantificar 8 antidepressivos (amitriptilina, maprotilina, clomipramina, sertralina, fluoxetina, nortriptilina, dotiepina e trazodona) em plasma por extracção em fase sólida e cromatografia líquida acoplada a um detector de diodo array (UPLC/DAD).
2. Validação da metodologia no doseamento plasmático de forma a poder aplicar este método na terapêutica clínica.

Para isso será realizada a validação da técnica proposta atrás mencionada através dos seguintes parâmetros: selectividade, especificidade, curva de calibração e linearidade, limite inferior de quantificação (LLOQ), limite de detecção (LOD), precisão, exactidão e recuperação.



REVISÃO DA LITERATURA

1. ANTIDEPRESSIVOS

As doenças mentais são doenças de etiologia complexa, abrangendo alterações ao nível da cognição, das emoções e do controlo comportamental. São uma interferência na aprendizagem das crianças bem como na capacidade dos adultos desempenharem as suas funções na sociedade. De uma forma geral iniciam-se precocemente no percurso de vida, tornando-se frequentemente uma situação recorrente e crónica, acabando por afectar, aproximadamente 121 milhões de pessoas no mundo inteiro. ^[1,2]

De forma a tentar compreender os factores desencadeantes deste tipo de doenças têm sido realizados estudos que dão conhecimento de interacções entre múltiplos factores de risco genéticos e não genéticos. O objectivo consiste em identificar genes responsáveis pela vulnerabilidade acrescida a estas doenças, e ao que parece, os resultados iniciais nesta área têm sido promissores. ^[1]

Nos últimos anos, foi também revelado que a depressão pode estar relacionada com processos neurodegenerativos que levam à perda de conexão sináptica e, por vezes, de redes neuronais nas estruturas do cérebro límbico, incluindo o hipocampo e o córtex. Vários estudos já demonstraram que o volume do hipocampo e do córtex pré-frontal estão reduzidos e estudos de imagem estrutural têm comprovado a redução do volume da substância cinzenta em doentes deprimidos. ^[3]

No que diz respeito à influência do género na doença, admite-se que a mesma seja mais comum nas mulheres que nos homens por uma diversidade de causas: factores biológicos, hormonais, psicossociais e ciclo de vida. ^[4] Um estudo realizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2000, mostrou que a prevalência de episódios de depressão unipolar é de 1,9 % nos homens e de 3,2 % nas mulheres. ^[5] Através da informação retirada de um outro estudo, este realizado na Austrália, é reforçada a indicação de que há um maior consumo de antidepressivos (AD) nas mulheres que nos homens, o que fortalece a ideia atrás exposta. ^[6]

O conceito de depressão é ambíguo, retratando uma condição humana multidimensional. Os números são indicadores de que tal patologia está a alastrar-se na população em geral, acabando por se tornar um fenómeno com elevada relevância social. ^[7,8]

É de forma assertiva que a depressão é ponderada como uma patologia mental comum mas grave. Consequentemente para a maioria dos indivíduos que sofre desta patologia impõe-se um tratamento de forma a restituir a sua saúde.

De uma forma geral, grande parte da população humana já se sentiu, ocasionalmente, triste ou frustrada, acabando, em determinadas situações, por ser um processo transitório que se

resolve num período de poucos dias. Sabe-se ainda que quando um indivíduo padece de depressão, esta patologia interfere não só com o seu quotidiano e normal funcionamento, como também se imiscui na vida das pessoas que integram o seu círculo próximo. ^[4]

O Plano Nacional de Saúde (PNS) 2000-2010 reconhece a depressão como um problema primordial de saúde pública, enunciando que a mesma pode afectar pessoas de todas as idades. No caso de a depressão não ser tratada, pode conduzir ao suicídio, um conseqüência frequente. Estima-se que esta doença esteja associada à perda de 850 mil vidas por ano, mais de 1200 mortes em Portugal. ^[5]

Os sintomas abrangidos nesta patologia são de natureza fisiológica, comportamental, cognitiva e psicótica. O sintoma primordial consta de um distúrbio de humor. E, não menos importante, é o frequente estado de anedonia em que os indivíduos afectados se encontram. ^[1] Este conjunto de sintomas (síndrome) foi nomeado, descrito e classificado como um dos transtornos de humor, na edição de 1980, do manual de diagnóstico da *American Psychiatric Association*. ^[7]

O correcto diagnóstico de depressão é um dos pontos fulcrais para que o seu tratamento seja exequível. Assim sendo, segundo o Manual de Diagnóstico e Estatística das Perturbações Mentais (DSM-IV), os critérios de diagnóstico de depressão, são os seguintes:

Presença de, pelo menos, 5 dos seguintes sintomas, pelo período mínimo de 2 semanas, sendo que, pelo menos, o humor depressivo ou a perda de interesse ou prazer, têm que estar presentes:

- humor depressivo durante a maior parte do dia , quase todos os dias (citando o DSM-IV 1996);
- perda de interesse ou prazer na maioria das actividades, durante a maior parte do dia, ocorrendo isto quase todos os dias;
- perda ou ganho acentuado de peso na ausência de dieta para tal;
- insónia ou hiperinsónia na maioria dos dias;
- existência de agitação ou inibição psicomotora, quase todos os dias;
- fadiga ou perda de energia que se manifesta quase todos os dias;
- sentimentos de desvalorização pessoal ou culpa excessiva e inapropriada;
- dificuldades em pensar ou concentra-se e em tomar decisões, quase todos os dias;
- pensamentos recorrentes relativamente à morte e suicídio. ^[9]

Desta forma, a apresentação da doença resume-se a um quadro que ilustra, entre outros, sintomas psicomotores, distúrbios do sono e somáticos, dor, ansiedade, variações

comportamentais no quotidiano e que oscilam com os padrões sazonais. Devido à heterogeneidade das imagens que podem ser apresentadas num determinado quadro, cada doente é um caso ímpar. ^[8]

De acordo com a sua duração a depressão pode ser episódica, recorrente ou crónica. Aproximadamente 20% dos casos convertem-se numa doença crónica sem remissão. E muitas vezes, estas ocorrências devem-se, fundamentalmente, à falta de tratamento adequado. ^[5] Assim sendo e uma vez que, esta patologia está associada a episódios de grande duração, altas taxas de cronicidade, recaídas e elevada morbidade e mortalidade é importante reconhecer e tratar os casos de depressão de forma íntegra. Tal procedimento é importante já que influi não só ao nível da qualidade de vida e produtividade dos doentes, como também ao nível dos PNS, uma vez que, os doentes que não são correctamente tratados afiguram um maior custo para o Sistema Nacional de Saúde (SNS). ^[10]

Estudos exaustivos alusivos à doença e sua terapêutica têm resultado no aperfeiçoamento de esquemas posológicos, psicoterapias e noutros métodos de abordagem e tratamento. ^[4]

No que diz respeito aos tipos de depressão, são a depressão *major* e a distímia as formas mais comuns. A depressão *major* assinala uma combinação de sintomas que interfere com diversos domínios: capacidade de trabalhar, sono, estudo, apetite e prazer sentido nas actividades preconizadas pelo indivíduo. ^[4] Esta é também conhecida por depressão endógena ou psicose maníaco-depressiva. ^[11] A distímia manifesta-se durante um período prolongado (2 anos ou mais) mas menos severo, em que os sintomas podem não incapacitar o indivíduo mas podem dificultar o seu normal funcionamento e bem-estar. ^[4] Esta era previamente conhecida como neurose depressiva. ^[11]

Além destas formas há também outras a considerar, designadamente a depressão psicótica (quando a depressão severa é acompanhada por alguma forma de psicose, tal como, alucinações, ilusões ou mesmo perda do sentido de realidade), a depressão pós-parto (assinalada por episódio de depressão *major* na mãe diagnosticado até um mês após o parto) e a depressão afectiva sazonal (se o início da depressão surgir durante os meses de Inverno, quando há menos luz solar natural). ^[4]

1.1. CONCEITO DE DEPRESSÃO

O fundamento químico para a depressão, nos últimos 50 anos, tem sido descrito através da hipótese das monoaminas, que postula que a debilitante patologia e os frequentes sintomas crónicos da mesma resultam de perturbações ao nível da transmissão de serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) e/ou dopamina (DA). De forma curiosa, um dos suportes a esta hipótese química da depressão consiste em dados clínicos registados em 1960, que apontam para o

facto dos efeitos prejudiciais no humor provocados pela reserpina, um agente antihipertensivo, estarem associados à depleção de monoaminas que esta provoca no cérebro. [3]

A reserpina, sendo um alcalóide de origem natural é um dos fármacos usados há mais tempo no tratamento da hipertensão arterial. É de eficácia anti-hipertensora modesta, com efeitos adversos que justificam uma utilização cada vez menos frequente. A reserpina bloqueia a captação das monoaminas pelas vesículas neuronais, o que origina uma depleção da NA, DA, 5-HT e neuropéptido Y nos neurónios centrais e periféricos. Ao bloquear a acção da NA, provoca, entre outros efeitos, redução da frequência cardíaca e vasodilatação. Como efeitos adversos é de realçar o facto de a reserpina provocar ou exacerbar quadros de depressão, geralmente de início insidioso, por vezes levando mesmo ao suicídio. Tal situação é explicável pelo declínio dos níveis de determinados neurotransmissores (NT). [11]

1.2. HISTÓRIA: DO 1º ANTIDEPRESSIVO À TERAPÊUTICA ACTUAL

A descoberta no final da década de 50 de fármacos antidepressivos e a sua utilização na prática clínica traduziu um passo marcante no tratamento e na compreensão de possíveis mecanismos subjacentes aos transtornos depressivos. [10] Foram então sintetizados numerosos fármacos e posteriormente introduzidos na clínica diária. Embora com estruturas químicas e mecanismos de acção distintos, todos influenciavam a concentração de NT ao nível da fenda sináptica, determinando modificações adaptativas dos receptores pré e pós-sinápticos, que por sua vez explicaria o processo de cura. [11]

Em 1957 foram introduzidos na clínica os dois primeiros AD, a imipramina e a iproniazida, agentes de duas famílias farmacológicas distintas: os antidepressivos tricíclicos (TCA) e os inibidores da monoamino-oxidase (MAOI), respectivamente. O desenvolvimento destes dois agentes possibilitou uma evolução no conhecimento da etiopatogenia dos transtornos afectivos, ao permitir o postulado da hipótese monoaminérgica da depressão, durante a década de 60, que patenteava uma deficiência funcional da neurotransmissão noradrenérgica e/ou serotoninérgica, com base no efeito bloqueador da recaptação sináptica destas aminas por parte da imipramina, ou na inibição da monoamino-oxidase (MAO), no caso da iproniazida. [12]

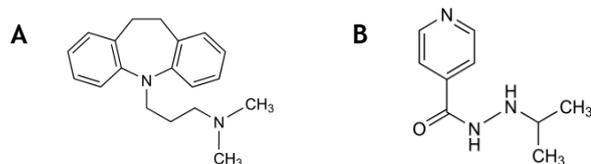


Figura 1 - Estrura química da imipramina (A) e da isoniazida (B). ^[28,45]

A origem da iproniazida, um isopropil derivado da isoniazida, encontra-se nos agentes antituberculosos que eram usados desde o início da década de 1950. Os primeiros dados sobre os efeitos da iproniazida em doentes depressivos não tuberculosos foram comunicados por Kline *et al.* em 1957, abrindo as portas ao primeiro grupo de fármacos especificamente AD (os MAOI).

Simultaneamente, teve lugar outro grande avanço histórico no tratamento da depressão: a descoberta dos TCA, cujo primeiro expoente e prototipo, já referido, foi a imipramina. A história destes antidepressivos começou nos primeiros anos da década de 1950, graças ao desenvolvimento de substâncias iminodibenzólicas estudadas nessa altura como sendo possíveis agentes antihistamínicos. A imipramina viu a sua comercialização na Primavera de 1958. Já no que diz respeito à iproniazida, a sua vida comercial foi curta, tendo sido retirada do mercado americano em 1961 por questões de segurança (icterícia e nefrotoxicidade). ^[13]

Assim, pode-se encarar que até aos anos 80 existiram duas grandes classes de antidepressivos, os TCA e os MAOI. Embora muito eficazes, descreviam efeitos adversos indesejáveis originados pela inespecificidade da sua acção farmacológica, sendo potencialmente letais em casos de sobredosagem. ^[10]

De forma a superar as lacunas deste tipo de fármacos, nas últimas décadas foram surgindo novas classes de antidepressivos. Estas diferem dos clássicos TCA e MAOI (ambos irreversíveis na selectividade farmacológica), acabando por modificar e atenuar os seus efeitos adversos característicos. ^[14] Assim sendo, desde os finais de 1980, toda uma nova geração de agentes não correlacionados do ponto de vista químico e neurofarmacológico tem sido introduzida. Esses fármacos aparentam ser seguros e melhor tolerados e incluem: os inibidores selectivos da recaptção de serotonina (SSRI), os antidepressivos serotoninérgicos específicos e noradrenérgicos (NaSSA), os MAOI selectivos e reversíveis, e os potentes inibidores da recaptção de serotonina e noradrenalina (SNRI). ^[15] Esta última classe é conhecida pelo facto de exhibir um início de acção mais rápido e por ser mais efectiva no tratamento da depressão que é refractária aos outros tipos de antidepressivos. ^[3]

Assim sendo, tem-se uma 1ª geração de AD que incluem os MAOI e os TCA e uma 2ª geração de AD que englobam os SSRI, os SNRI, os NaSSA, e ainda os inibidores da recaptção de

noradrenalina (NARI) e os inibidores da recaptção de serotonina/ antagonistas dos receptores de 5-HT_{2A} (SARI) [8]

Os AD considerados recentes, como a moclobemida, um inibidor selectivo da monoaminoxidase do tipo A (MAOI-A), a paroxetina, a fluoxetina e a sertralina (SSRI) são, no entanto, tão eficazes como os antidepressivos existentes há mais tempo. Contudo, têm menos efeitos secundários e são mais seguros em caso de sobredosagem. Apesar do maior custo associado aos fármacos recentemente introduzidos, o mesmo pode ser compensado pela sua maior tolerabilidade, levando a um tratamento mais eficaz e a uma maior segurança. Por isso mesmo, estão a ser considerados, cada vez mais, como terapêutica inicial para a depressão. [16]

1.3. NOVA ABORDAGEM TERAPÊUTICA

A agomelatina, um análogo químico da melatonina, cujo desenvolvimento teve como base o estudo dos ritmos circadianos, é apontada como uma alternativa válida para o tratamento da depressão. [8] A sua autorização de comercialização foi concedida em 2009 na Europa, tornando-se o 1º antidepressivo aprovado que incorpora um mecanismo de acção não monoaminérgico. [17]

O seu mecanismo de acção passa por um agonismo melatonérgico em ambos os receptores de melatonina (MT₁ e MT₂) e um antagonismo ao nível dos receptores 5-HT_{2C} e 5-HT_{2B}. [8] Sabe-se que tem eficácia antidepressiva através da ressincronização dos ritmos circadianos, que estão alterados em caso de depressão. [18]

De forma sucinta, a agomelatina aumenta os níveis de DA e NA no córtex frontal sem alterar os níveis de 5-HT. E é este modo de actuação que contribui para um perfil farmacológico único, com uma acção antidepressiva eficaz com relativa ausência de efeitos adversos graves. Tal comportamento está ligado à ausência de estimulação dos receptores 5-HT_{2A}. [8,18,19]

Este composto tem um início de acção relativamente precoce, bem como um excelente nível de segurança e perfil de tolerabilidade, associado a uma taxa de abandono residual neste tipo de doentes. A agomelatina, para além dos efeitos antidepressivos aos quais está associada, tem também potencial ansiolítico, com um benefício tanto em sintomas de ansiedade associados ao transtorno depressivo *major* como no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada. [19] Do ponto de vista clínico, a sua administração num esquema terapêutico de 25 mg/dia durante 6 semanas, contribui para restabelecer a arquitectura do sono em doentes depressivos. [8] No que diz respeito às desvantagens, este composto tem a particularidade de elevar as transaminases séricas particularmente com doses de 50 mg. Por isso mesmo, devem

ser realizados testes da função hepática, especialmente as enzimas alanina aminotransferase (ALAT) e aspartato aminotransferase (ASAT), no início do tratamento, depois periodicamente e sempre que clinicamente indicado. ^[18]

1.4. CLASSIFICAÇÃO DOS ANTIDEPRESSIVOS

Com a rápida expansão do arsenal de AD, um sistema de classificação aceitável é essencial para ajudar a praticar o processo, confuso por vezes, de selecção de agentes indicados entre a panóplia de alternativas terapêuticas.

Como foi referido atrás, historicamente, a classificação dos agentes antidepressivos foi bastante simples, isto é, eram apenas consideradas 2 classes: os TCA (agrupados tendo como critério a estrutura) e os MAOI (agrupados tendo como critério a função). ^[14] No entanto, devido à massiva disponibilidade de novos AD, a classificação baseada na estrutura tem tido cada vez menos utilidade e tem sido considerada complexa pelo uso incorrecto de termos como heterocíclicos, tricíclicos e tetracíclicos.

Assim sendo, o sistema de classificação aqui proposto, baseado no mecanismo de acção, apresenta vantagens heurísticas, na medida em que ao incorporar as teorias actuais da fisiopatologia da doença, pode facilmente incorporar novos agentes assim que eles estejam disponíveis, fornecendo uma base racional para a selecção do tratamento sequencial na prática clínica. Embora a conexão entre os mecanismos de acção e a resposta dos AD seja hipotética, este tipo de classificação é baseado na farmacologia estabelecida para os mesmos.

De forma mais simplificada e tendo também como base a função dos AD surge então uma classificação que divide os fármacos em três categorias principais, definidas pelo mecanismo biológico presumivelmente responsável por mediar a eficácia antidepressiva. As três categorias principais incluem: inibidores da recaptção neural de NT; inibidores do metabolismo enzimático de NT e antagonistas de receptores de aminas biogénicas. Neste tipo de classificação, os fármacos incluídos dentro de uma classe podem ainda ser subdivididos de acordo com seu grau de selectividade como se verá a seguir. Assim sendo, dentro das três principais categorias de AD, os fármacos são classificados quanto à sua selectividade para um NT específico, à selectividade para o mecanismo primário de acção antidepressiva em relação a outras acções biológicas não antidepressivas, e quanto à presença combinada de mais de um mecanismo antidepressivo. (Tabela 1). ^[20]

Tabela 1 - Organização dos agentes antidepressivos em 3 classes principais tendo como base o presumível mecanismo de acção responsável pela sua eficácia^a. [20]

INIBIDORES DA RECAPTAÇÃO DE AMINAS	Inibidores selectivos da recaptação de 5-HT ^b	Fluoxetina Sertralina Paroxetina Fluvoxamina		
	Inibidores selectivos da recaptação NA ^b	Desipramina Maprotilina		
	Inibidores da recaptação combinada de NA - 5-HT	SELECTIVOS ^b	Venlafaxina	
		NÃO SELECTIVOS ^c	Nortriptilina Tricíclicos de aminas terciárias (amitriptilina, clomipramina, doxepina, imipramina, trimipramina)	
	Inibidores da recaptação combinada de NA-DA	SELECTIVOS ^b	Bupropiona	
INIBIDORES DO METABOLISMO ENZIMÁTICO	Inibidores da MAO irreversíveis/não selectivos ^d	Fenelzina Tranilcipromina Isocarbozazida		
	Inibidores da MAO-A reversíveis/selectivos	Moclobemida ^e		
ANTAGONISTAS DE RECEPTORES ^f	Antagonista do receptor 5HT _{2A}	NÃO SELECTIVO ^c	Trazodona	
	Antagonista do receptor 5HT _{2A} e inibidor da recaptação de serotonina	NÃO SELECTIVO ^c	Nefazodona	
	Antagonista combinado dos receptores 5HT _{2A} , 5HT _{2C} e α-2	NÃO SELECTIVO ^c	Mirtazapina	

Notas:

a - Acção proeminente de um fármaco sobre a transmissão de aminas biogénicas no Sistema Nervoso Central (SNC).

b - Em doses superiores às recomendadas para o tratamento de rotina da depressão a selectividade pode ser perdida.

c - A não selectividade refere-se aos fármacos com potencial para mecanismos não antidepressivos que sejam superiores ou que estejam no intervalo da ordem de grandeza da potência do mecanismo antidepressivo suposto.

d - OS MAOI, devido ao seu efeito fundamental na potenciação da NT de 5-HT, NA e DA.

e - A moclobemida é o primeiro inibidor reversível da monoamina oxidase do tipo A (RIMA).

f - A classe de antagonistas de receptores identifica apenas receptores que, actualmente se constatare, estarem envolvidos na depressão ou correlacionados com a resposta do AD. As subdivisões dentro dessa classe são com base na farmacologia do composto original e em dados sobre os metabolitos activos, quando disponíveis. [20]

1.5. FÁRMACOS SELECIONADOS PARA A REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO

De seguida será apresentada uma abordagem relativamente aos aspectos mais importantes dos fármacos a analisar neste trabalho. Serão mencionados aspectos de índole físico-química, uma vez que, o conhecimento das propriedades físico-químicas dos analitos é de extrema importância para evitar problemas na quantificação, já que, estes podem estar relacionados

com reacções secundárias, com impurezas ou degradação na sua estrutura durante a aplicação do método analítico. ^[21] A maior parte dos fármacos psicotrópicos é semelhante no que diz respeito às propriedades químicas, de salientar, a elevada lipofilia, o relativo peso molecular e a basicidade que os caracteriza. ^[22]

Não menos importante para a compreensão da natureza dos fármacos, são os aspectos associados ao mecanismo de acção, aos efeitos adversos, às propriedades farmacocinéticas e às situações de sobredosagem. ^[21]

Os fármacos de estudo serão: a amitriptilina, a maprotilina, a clomipramina, a sertralina, a fluoxetina, a venlafaxina e a trazodona.

1.6. ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS (TCA)

Os TCA são assim denominados devido à estrutura química dos seus principais representantes (derivados dibenzazepínicos e seus isómeros). ^[11] Este grupo convencional foi descoberto a partir da síntese de derivados dibenzazepínicos, em 1951, inicialmente desenvolvidos e utilizados na terapêutica, devido às suas propriedades sedativas e analgésicas em animais. Durante a investigação clínica de isómeros fenotiazínicos, Kunh observou, fortuitamente, que diferentemente dos protótipos, os novos derivados tinham efeito apreciável em doentes deprimidos. ^[23]

Os TCA são semelhantes do ponto de vista estrutural e da disposição espacial, pelo que não surpreende que as suas acções farmacológicas e eficácia terapêutica sejam praticamente sobreponíveis. ^[11] Como já foi mencionado anteriormente, a imipramina foi o primeiro TCA a ser descoberto, nos anos 50. ^[24]

As características estruturais comuns aos TCA clássicos estão indicadas na figura 2, utilizando a estrutura do protótipo: imipramina. Em função da natureza do ciclo central tem-se:

1. Ciclo sem heteroátomos: amitriptilina, nortriptilina, butriptilina, protriptilina, amineptina, noxiptilina e melitraceno;
2. Ciclo com um heteroátomo que, preferencialmente, é o azoto: imipramina, desipramina, clomipramina, lofepramina, trimipramina, opipramol; no entanto também pode o oxigénio e neste caso tem-se: doxepina; ou ainda enxofre: dosulepina.
3. Ciclo com mais de um heteroátomo: dibenzepina, amoxapina e tianeptina. ^[25]

A maprotilina é um antidepressivo tetracíclico, inibidor não selectivo da recaptação de monoaminas, que partilha uma série de propriedades terapêuticas com os TCA, daí que seja

enquadrado neste grupo. No entanto é estrutural e farmacologicamente diferente dos fármacos abrangidos por este grupo de AD. [26]

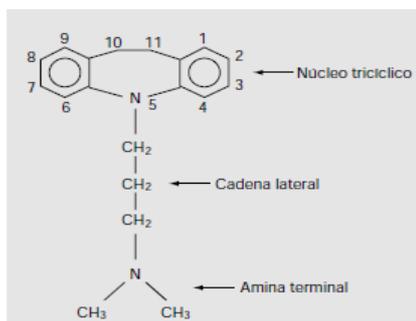


Figura 2 - Características estruturais dos antidepressivos tricíclicos, tendo como modelo a molécula de imipramina. [25]

1.6.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Segue-se uma tabela que resume as principais características físico-químicas dos antidepressivos cíclicos em estudo.

Tabela 2 - Estruturas químicas e características físico-químicas dos antidepressivos tricíclicos e tetracíclicos em estudo.

Antidepressivo	Estrutura química	Peso molecular (g/mol)	Aspecto	Solubilidade	pKa (25°C)
Amitriptilina		277,4	Pó de cor amarela ou acastanhada.	Praticamente insolúvel em água, solúvel 1 em 120 de etanol, 1 em 6 de acetona, e 1 em 8 de clorofórmio.	9,4
Maprotilina		277.4	Pó cristalino de cor branca.	Pouco solúvel em água, solúvel em metanol e clorofórmio, praticamente insolúvel em iso-octano.	-
Clomipramina		314,9	Pó cristalino de cor branca ou ligeiramente amarelada.	Solúvel 1 em 8 de água, 1 em 5 de etanol, 1 em 3 de clorofórmio, e 1 em 100 de éter.	-

1.6.2. MECANISMO DE ACÇÃO

O mecanismo de acção comum aos TCA ao nível pré-sináptico é o bloqueio de recaptação de monoaminas, principalmente NA e 5-HT, e em menor proporção DA. As aminas terciárias inibem preferencialmente a recaptação de 5-HT e as aminas secundárias a de NA. A actividade pós-sináptica varia de acordo com o sistema neurotransmissor envolvido e geralmente é responsável pelos efeitos indesejáveis. Os TCA bloqueiam os receptores muscarínicos (colinérgicos), histaminícos de tipo 1, α_2 e β -adrenérgicos, serotoninérgicos e mais raramente os dopaminérgicos. [14] Na tabela 3 pode-se constatar a afinidade destes fármacos por diversos receptores, bem como a sua potência no bloqueio da recaptação.

Geralmente é considerada a existência de um atraso de 2 a 4 semanas até os efeitos dos fármacos tricíclicos se tornarem aparentes. A explicação para este facto conta com razões farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Do ponto de vista farmacocinético, a maioria dos TCA tem $t_{1/2}$ plasmáticos longos e o tratamento necessita de ser iniciado com metade da dose terapêutica usual, de forma a minimizar os efeitos adversos; isto resulta em concentrações plasmáticas terapêuticas que são alcançadas apenas após um período de 2 ou mais semanas. No que concerne à natureza farmacodinâmica, a justificação baseia-se no facto de a resposta terapêutica ser baseada em alterações secundárias na função de receptores do cérebro, que ocorrem de forma lenta. [27]

Tabela 3 - Afinidade pelos receptores e potência dos antidepressivos cíclicos sobre o cérebro humano. [28]

Fármacos	Afinidade pelo receptor						Potência - bloqueio da recaptação		
	α_1	α_2	H 1	Muscarínico tipo 1	5-HT tipo 1	5-HT tipo 2	5-HT	NA	DA
Amitriptilina	3,7	0,11	91	5,6	0,53	3,4	23	2,9	0,031
Clomipramina	2,6	0,03	3,2	2,7	0,01	3,7	360	2,6	0,046
Maprotilina	1,1	0,01	50,0	0,18	0,01	0,83	0,017	9,0	0,1

Nota: afinidade e potência = $10 \times 1/K_d$ = constante de equilíbrio de dissociação em molaridade.

1.6.3. EFEITOS ADVERSOS

Os efeitos adversos dos ADT são relativamente frequentes, com uma prevalência estimada em cerca de 5%. A maioria desses efeitos está relacionada com a sua actividade anticolinérgica. [23] A ampla gama de efeitos adversos problemáticos associada a este tipo de AD pode ser letal

quando os mesmos são administrados em doses excessivas. ^[28] Na tabela 4 estão descritos e resumidos os principais efeitos adversos deste grupo de fármacos.

Tabela 4 - Efeitos adversos comuns à classe de antidepressivos tricíclicos.

Efeitos anticolinérgicos	Boca seca e gosto metálico, epigastralgias, obstipação, tonturas, palpitações, visão turva e retenção urinária. ^[11]
Efeitos cardiovasculares	Hipotensão postural e taquicardia. ^[14,28] Em concentrações plasmáticas elevadas estes medicamentos podem tornar-se arritmogênicos. ^[28]
Efeitos neurológicos	Ocorrência de tremores das mãos, sedação, mioclonias, parestesias, agitação e hiperestimulação paradoxal e estados confusionais podem ocorrer em idosos. ^[14]
Efeitos psiquiátricos	Exacerbação de transtornos psicóticos em indivíduos susceptíveis. ^[28]
Efeitos metabólicos e endócrinos	Aumento da secreção de prolactina. ^[14]
Reacções cutâneas	Exantemas, urticária, dermatite esfoliativa e fotossensibilidade; ocorrem em 2% a 4% dos doentes nas duas primeiras semanas de tratamento. ^[14]
Efeitos hepáticos	Aumento ligeiro e autolimitado das concentrações das transaminases séricas. Podem desencadear também uma hepatite fulminante aguda em 0,1 a 1% dos indivíduos. ^[28]

Outros efeitos indesejáveis não menos importantes consistem nos que podem ser confundidos com a própria sintomatologia depressiva. Estão incluídos neste ítem: aumento de peso principalmente com a amitriptilina e a imipramina; disfunções sexuais (redução da libido); alterações do sono (pesadelos, alucinações hipnagógicas e hipnopômicas). ^[14]

Relativamente à maprotilina e clomipramina, os efeitos indesejáveis são geralmente de carácter ligeiro e transitório, desaparecendo com a continuação do tratamento ou após a redução da posologia. Estes efeitos nem sempre apresentam uma correlação com os níveis plasmáticos do fármaco ou com a dose. ^[26,29]

No caso da amitriptilina muitos efeitos indesejáveis estão relacionados com o efeito anticolinérgico do fármaco e podem muitas vezes ser controlados por ajuste da posologia. Os mais comuns são sonolência (aproximadamente 20%) e distúrbios da acomodação (aproximadamente 10%). ^[30] De forma a possibilitar uma visão geral da intensidade dos efeitos adversos predominantes destes três fármacos é apresentada de seguida a tabela 5.

Tabela 5 - Perfil dos efeitos adversos *major* para os antidepressivos cíclicos.

Fármaco	Efeitos adversos		
	Sedativos	Anticolinérgicos	Hipotensão postural
Amitriptilina	+++	+++	++
Clomipramina	++	++	+
Maprotilina	++	±	+
Símbolos: ± = raro ou negligenciável; + = incomum; ++ = comum ou moderado; +++ = frequente ou severo.			

1.6.4. FARMACOCINÉTICA

Existe uma variabilidade interindividual muito grande nas concentrações plasmáticas obtidas após a administração de uma mesma dose, assim como na percentagem de ligação às proteínas plasmáticas (PP). Desta forma surge a necessidade de se proceder a uma individualização da dose, realizada empiricamente a partir dos resultados clínicos alcançados, já que não é fácil determinar as concentrações plasmáticas destes fármacos, e pode acontecer que não exista uma correlação entre as concentrações plasmáticas e os efeitos terapêuticos. ^[11]

Os TCA são fármacos que, de forma geral, possuem uma boa absorção por via oral, e ligam-se fortemente às PP (80-95%), pelo que, a sua biodisponibilidade (BD) é geralmente baixa. ^[14] Por exemplo, a BD varia entre 55-80% para a nortriptilina, 30-60% para a amitriptilina, 36-62% para a clomipramina e 79-87% para a maprotilina. ^[27,31]

De uma forma geral a absorção da maioria dos TCA é completa após a administração oral. ^[28] Por isso mesmo podem ser detectados no plasma poucos minutos após a administração oral. ^[27]

Tal como acontece com as fenotiazinas, o tempo de semi-vida ($t_{1/2}$) plasmática dos TCA manifesta uma demarcada variabilidade interindividual. Os idosos e os indivíduos que apresentem dano hepático irão consequentemente exibir um metabolismo reduzido (e portanto $t_{1/2}$ prolongados), o que pode estar associado às elevadas concentrações plasmáticas em *steady-state*.

As concentrações *steady-state* variam amplamente e são geralmente alcançadas entre 1 a 4 semanas, dependendo do fármaco e do doente. Contudo, é frequente iniciar o tratamento antidepressivo com metade da dose usual durante várias semanas, até o equilíbrio da dose total ser alcançado. ^[27]

O facto de estes fármacos apresentarem $t_{1/2}$ longos possibilita a sua administração uma vez ao dia, sendo geralmente necessários 5 a 7 dias para atingir as concentrações plasmáticas com níveis estáveis. [28]

Na forma livre, alcançam rapidamente os diferentes tecidos, apresentando um volume de distribuição (Vd) alto (10-50 L/Kg). [14] Os valores de Vd (L/Kg) para a amitriptilina, clomipramina e maprotilina são respectivamente: 6,4-36, 9-25 e 16-32. [31]

Os TCA apresentam elevada lipossolubilidade o que possibilita que atravessem a barreira placentária e passem para o leite materno, onde podem alcançar elevadas concentrações. [14] Assim, pode-se dizer que a distribuição é rápida, com os fármacos a atravessar facilmente a barreira hematoencefálica. Além disso, as concentrações também são elevadas no fígado, nas glândulas adrenais, no pulmão, no cérebro e no coração. [27]

Este grupo de AD sofre também um metabolismo significativo pelo efeito de primeira passagem. O metabolismo hepático ocorre ao nível do sistema enzimático do citocromo P450. Podem ocorrer interacções medicamentosas clinicamente relevantes na competição pela enzima CYP 2D6 entre os TCA e a quinidina, a cimetidina, a fluoxetina, a sertralina, a paroxetina, as fenotiazinas, a carbamazepina e os antiarrítmicos tipo propafenona e flecainida. A administração concomitante dos TCA e desses inibidores pode consecutivamente tornar o seu metabolismo mais lento e aumentar as concentrações plasmáticas dos antidepressivos. Além disso, variações genéticas na actividade do CYP 2D6 podem ser responsáveis por diferenças de, até 40 vezes, nas concentrações plasmáticas dos TCA em diferentes indivíduos. [28]

A eliminação ocorre, principalmente, por via do metabolismo hepático. As transformações nas cadeias laterais são o passo metabólico mais importante. No caso das aminas terciárias, como a imipramina e a amitriptilina, a metabolização passa pela desmetilação com formação de metabolitos activos na forma de aminas secundárias, desipramina e nortriptilina, respectivamente. Sabe-se ainda que, por vezes, tal como acontece com a clomipramina, o metabolito alcança maior concentração plasmática *steady-state* do que o composto original. A hidroxilação do anel é outra etapa importante no metabolismo deste grupo de AD, e esta leva à formação de compostos conjugados, geralmente glucuronideos. Os compostos com anel hidroxilado têm maior tendência para ser mais inactivos farmacologicamente, não deixando com isso de poderem permanecer presentes em concentrações bastante eminentes. [27] Assim, de forma resumida, o metabolismo dos TCA ocorre por duas vias fundamentais: a N-desmetilação e a hidroxilação do anel aromático, originando metabolitos que, em geral, mantêm a sua actividade biológica ou parte dela. A inactivação ocorre por glucuronidação dos metabolitos oxidados, originando derivados que são excretados na urina. [14]

De forma a simplificar a avaliação farmacocinética dos AD tricíclicos (amitriptilina, clomipramina) e tetracíclicos (maprotilina), será apresentada a tabela 6 com as principais variações de $t_{1/2}$ e metabolismo.

Tabela 6 - Características farmacocinéticas dos antidepressivos cíclicos em estudo. [27]

Fármaco	T _{1/2} (horas)	Via de eliminação	Comentários
Amitriptilina	32-40	Metabolismo hepático (metabolitos activos).	O metabolito activo (nortriptilina) pode eventualmente acumular-se em maiores concentrações que o composto original.
Clomipramina	17-28	Metabolismo hepático.	Provável metabolismo de 1ª passagem significativo após administração oral.
Maprotilina	27-58	Metabolismo hepático.	-

1.6.5. SOBREDOSAGEM

As *overdoses* com os TCA são graves e frequentemente podem ser fatais. Os sintomas de *overdose* incluem: agitação, convulsões, hipoprístaltismo, alterações na pressão arterial e na temperatura corporal e manifestação de midríase. O doente segue um percurso que progride para o coma e, muitas vezes, para depressão respiratória, que leva à morte. [28]

1.7. INIBIDORES SELECTIVOS DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA (SSRI)

Os SSRI são o resultado da pesquisa racional para encontrar medicamentos tão eficazes quanto os TCA, mas com menos problemas de tolerabilidade e segurança. [14]

O primeiro SSRI, a fluoxetina, foi introduzido em 1987 e alterou a atitude sobre o tratamento farmacológico da depressão. As razões para isso incluíram dois aspectos essenciais: por um lado os efeitos adversos iniciais da fluoxetina eram, em geral, melhor tolerados do que os dos tratamentos já existentes, como os TCA e os dos MAOI, e por outro lado a fluoxetina apresentava uma posologia simplificada. Subsequentemente, outros SSRI foram introduzidos, partilhando as mesmas propriedades básicas da fluoxetina. [28] Os SSRI constituem um grupo

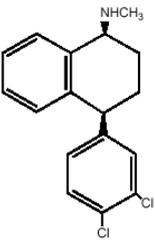
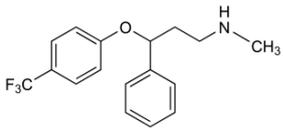
heterogéneo do ponto de vista químico, mas com efeitos terapêuticos muito próximos dos tricíclicos. ^[25] Distinguem-se dos TCA por interferirem exclusivamente na recaptação da 5-HT e por serem igualmente mais seguros em casos de intoxicação. ^[11]

Os SSRI são estrutural e quimicamente diferentes entre si. Essa diversidade molecular explica por que as respostas individuais e a tolerabilidade aos SSRI são tão variadas. ^[28]

1.7.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

De forma a facilitar a compreensão da natureza dos SSRI são descritas, na tabela 7, algumas das suas propriedades físico-químicas mais relevantes.

Tabela 7 - Estruturas químicas e características físico-químicas dos inibidores selectivos da recaptação de serotonina em estudo.

Antidepressivo	Estrutura química	Peso molecular (g/mol)	Aspecto	Solubilidade	pKa (25°C)
Sertralina		342,7	Pó cristalino de cor branca ou quase branca.	Solúvel em água, em clorofórmio: metanol (1:1), em solução metanólica de 0,1 M de ácido clorídrico, em dimetilsulfóxido, em etanol e N, N-dimetilformamida; praticamente insolúvel em solução aquosa 0,1 M de ácido clorídrico, solução aquosa 0,1 M de hidróxido de sódio, álcool isopropílico, acetona, acetato de etilo e acetonitrilo.	9,8
Fluoxetina		309,3	Pó cristalino de cor branca ou quase branca.	Solúvel em metanol, etanol, acetonitrilo, clorofórmio e acetona; pouco solúvel em acetato de etilo, diclorometano e água (máximo de 14 g/L); insolúvel no tolueno, ciclohexano e hexano.	-

1.7.2. MECANISMO DE ACÇÃO

Acredita-se que os SSRI exerçam os seus efeitos terapêuticos pela inibição da recaptação da 5-HT. Devem o seu nome ao facto de exercerem pouco efeito sobre a recaptação de NA e da DA. ^[21] Os SSRI têm perfis farmacodinâmicos consideravelmente diferentes, uma vez que, eles são muito mais selectivos do que os TCA, não só relativamente à recaptação de monoaminas, como também devido à sua reduzida afinidade para outros receptores, tais como os receptores muscarínicos. ^[27]

1.7.3. EFEITOS ADVERSOS

Os principais efeitos secundários experimentados são a anorexia e perda de peso, náuseas, diarreia, cefaleias, insónia e alterações sexuais, nomeadamente diminuição da libido, anorgasmia e disfunção eréctil. ^[11] São então pormenorizados alguns dos efeitos adversos mais frequentes na tabela 8.

Tabela 8 - Efeitos adversos comuns à classe de inibidores selectivos da recaptação de serotonina. ^[14]

Gastrintestinais	Incidência de diarreia (mais comum com a sertralina do que com a fluoxetina).
Reacções dermatológicas	Mais frequentes com a fluoxetina. Aparecem na forma de urticária, que pode estar acompanhada por febre, artralgia e eosinofilia.
Efeitos psiquiátricos	Agitação, insónia, ansiedade e nervosismo.
Disfunção sexual	Retardo ejaculatório em homens e anorgasmia em mulheres.

Em relação à sertralina, estudos clínicos farmacológicos demonstraram que esta não afecta o desempenho psicomotor. ^[32] Quanto à fluoxetina, de todos os efeitos adversos associados à classe de SSRI são as alterações gastrintestinais as mais comuns (náuseas, vómitos, dispepsia, alterações do trânsito intestinal, anorexia e perda de peso), bem como as reacções de hipersensibilidade de todos os tipos incluindo anafilaxia. ^[33] Com a tabela 9 pode-se concluir que o perfil de efeitos adversos para estes dois fármacos é idêntico.

Tabela 9 - Perfil dos efeitos adversos *major* para os inibidores selectivos da recaptação de serotonina em estudo. ^[27]

Fármaco	Efeitos adversos		
	Sedativos	Anticolinérgicos	Hipotensão postural
Fluoxetina	±	±	±
Sertralina	±	±	±

Símbolos: ± = raro ou negligenciável; + = incomum; ++ = comum ou moderado; +++ = frequente ou severo

1.7.4. FARMACOCINÉTICA

Os SSRI são bem absorvidos com elevada BD oral. [27] A fluoxetina apresenta uma BD superior a 72%, enquanto a sertralina apresenta um valor relativamente mais baixo (superior a 44%). [31] Tal como os TCA, têm elevado Vd (sertralina = 25-50 L/Kg e fluoxetina = 12-43 L/Kg), elevada percentagem de ligação às PP (sertralina = 98% e fluoxetina = 94%), e são extensivamente metabolizados no fígado e amplamente excretados na urina na forma de metabolitos conjugados inactivos. [27,31] Atingem o pico máximo do seu efeito num intervalo de 3 a 8 horas. [28] Em relação ao $t_{1/2}$ plasmático dos SSRI, este varia de, aproximadamente 26 horas para a sertralina e 84 horas para a fluoxetina. [27]

Em relação ao metabolismo dos SSRI apenas a fluoxetina, a sertralina e o citalopram dão lugar a metabolitos que mantêm a actividade biológica. [25] A sertralina origina um metabolito activo, a desmetilsertralina, que apresenta um $t_{1/2}$ de, aproximadamente, 71 horas. [31] Quanto à fluoxetina o seu metabolismo é bastante complexo. Primeiro forma um metabolito (norfluoxetina) com um $t_{1/2}$ que varia de 77 a 235 horas. Significando isto que, o tempo necessário para atingir concentrações de *steady-state* após o início do tratamento, e a diminuição dos níveis da zona de planalto para zero com a interrupção do tratamento é de várias semanas. Esta situação tem implicações importantes quando se decide suspender o tratamento com um fármaco e instituir um outro diferente. Em segundo lugar, a cinética da fluoxetina é não linear, estando as elevadas doses associadas a concentrações plasmáticas desproporcionalmente elevadas. Além disso, após um longo período da administração, o $t_{1/2}$ da fluoxetina torna-se ainda mais prolongado, provavelmente devido ao facto de inibir o seu próprio metabolismo. A cinética não linear pode ser devida à saturação parcial desencadeada pelo metabolismo de 1ª passagem. Contudo apesar destas particularidades, a fluoxetina não manifesta um início de acção demasiadamente retardado. De uma forma geral, tal como os outros SSRI, é bem tolerada, mesmo no caso dos idosos. Contudo algumas interações podem ocorrer, devido aos seus efeitos sobre o sistema hepático microsomal CYP 2D6. [27]

Visto que os SSRI têm uma margem terapêutica ampla, é raro que outros medicamentos originem aumentos problemáticos nas suas concentrações. No entanto, quando co-administrados com outros fármacos, os SSRI originam frequentemente inibição do metabolismo desses medicamentos. [28]

Sabe-se ainda que, a administração crónica de fluoxetina em humanos, possibilita um aumento do $t_{1/2}$ de eliminação do mesmo, comparativamente à dose única. Com isto sugere-se um possível metabolismo auto-inibidor e/ou a saturação das enzimas microsomais. [34]

Para finalizar esta abordagem farmacocinética, a tabela 10 possibilita uma comparação entre a fluoxetina e a sertralina quanto ao $t_{1/2}$ e via de eliminação, apresentando a informação essencial.

Tabela 10 - Características farmacocinéticas dos inibidores selectivos da recaptação de serotonina em estudo.^[27]

Fármaco	T _{1/2} (horas)	Via de eliminação	Comentários
Fluoxetina	1-4 dias	Metabolismo hepático (metabolitos activos e inactivos); pequena excreção renal na forma de fármaco inalterado (≈2,5%).	Considerável variabilidade interindividual na taxa de eliminação. O metabolito activo <i>N</i> -desmetil (norfluoxetina) tem um t _{1/2} maior que o composto original (7-15 dias).
Sertralina	≈ 24	Metabolismo hepático (metabolitos inactivos).	Lentamente absorvida.

1.7.5. SOBREDOSAGEM

A selectividade de acção dos SSRI, que explica a redução no perfil de efeitos colaterais, pode, por outro lado, aumentar o risco de interacção com outras substâncias que afectem a transmissão serotoninérgica, levando ao aparecimento de sintomas que são frequentemente descritos como síndrome serotoninérgica. Os sintomas podem aparecer em casos de intoxicação por SSRI ou mesmo com o uso concomitante de doses terapêuticas de substâncias serotoninérgicas associadas, como TCA, MAOI, SSRI e lítio. Tal fenómeno também pode ocorrer na substituição entre substâncias, quando não ocorre o período de *wash-out* adequado para a total eliminação da substância.^[14] Este síndrome é potencialmente fatal, onde a hiperestimulação serotoninérgica compreende, diarreia, inquietação, agitação extrema, hiper-reflexia e instabilidade autónoma com possíveis rápidas flutuações dos sinais vitais, mioclonias, convulsões, hipertermia, calafrios incontroláveis e rigidez, delírio, coma, estado epiléptico, colapso cardiovascular e morte.^[28]

1.8. INIBIDORES SELECTIVOS DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA E NORADRENALINA (SNRI)

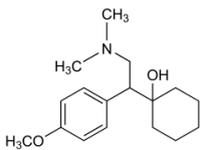
Com a “redescoberta” do papel provavelmente desempenhado pela NA na doença depressiva, o desenvolvimento da classe designada por SNRI constituiu uma extensão lógica da doença. Este grupo inclui a venlafaxina, o milnaciprano e a duloxetina, que apresentam uma acção de inibição na recaptação de ambas as monoaminas (5-HT e NA), sem actuarem directamente sobre receptores pós-sinápticos. Contudo não apresentam igual potência na inibição da recaptação de ambos os neurotransmissores. A afinidade da venlafaxina para a 5-HT é,

aproximadamente, 30 vezes superior à sua afinidade para a NA, enquanto que, a selectividade da duloxetine para a 5-HT é, aproximadamente, 10 vezes superior. Apenas o milnaciprano exerce uma acção equilibrada sobre os dois neurotransmissores, apresentando uma potência aproximadamente igual na inibição da recaptação de 5-HT e de NA. [35]

1.8.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

De seguida serão apresentadas as principais propriedades físico-químicas da venlafaxina (tabela 11).

Tabela 11 - Estrutura química e características físico-químicas da venlafaxina.

Antidepressivo	Estrutura química	Peso molecular (g/mol)	Aspecto	Solubilidade	pKa (25°C)
Venlafaxina		277,4	Pó cristalino de cor branca ou quase branca.	É solúvel em água a 572 g/ L.	-

1.8.2. MECANISMO DE ACÇÃO

O mecanismo de acção da venlafaxina passa pela inibição da recaptação de 5-HT e NA. Como foi referido anteriormente este fármaco apresenta maior potência na inibição da recaptação de 5-HT do que de NA.

A venlafaxina e o seu metabolito activo O-desmetilvenlafaxina (ODV) apresentam fraca actividade como inibidores da recaptação de DA (cl clinicamente significativo apenas com doses elevadas) e não apresentam afinidade para receptores adrenérgicos α_1 , receptores muscarínicos ou histamínicos, bem como não inibem a MAO. [5] Desta forma, distinguem-se dos TCA pela ausência de efeitos anticolinérgicos, anti-histamínicos e antiadrenérgicos. [28]

Sabe-se ainda que alteram a sensibilidade de receptores β -adrenérgicos após dose única, diferente de outros AD que levam à dessensibilização desses receptores após doses repetidas.

[14]

1.8.3. FARMACOCINÉTICA

A venlafaxina é rapidamente absorvida e a sua BD é de, aproximadamente 92%.^[31] A ingestão com alimentos retarda, porém não compromete a sua absorção.^[14] A venlafaxina tem um $t_{1/2}$ de, aproximadamente, 3,5 horas, e o ODV tem um $t_{1/2}$ de 9 horas.^[28]

A ligação às PP é moderada (cerca de 30% para a venlafaxina e 40% para o ODV).^[14] O Vd da venlafaxina encontra-se na faixa dos 9L/Kg.^[31] Além disso a venlafaxina sofre metabolização hepática com importante efeito de primeira passagem. Através de *O*-desmetilação pela isoenzima 2D6 do citocromo P450 (CYP2D6) origina o ODV. Alguns estudos *in vitro* evidenciam também o envolvimento do CYP3A4 na metabolização da venlafaxina a *N* desmetil-venlafaxina (menos activo que o ODV).^[14] Na forma de resumo, segue-se a tabela 12, com as principais características farmacocinéticas para a venlafaxina.

Tabela 12 - Características farmacocinéticas da venlafaxina.^[27]

Fármaco	T _{1/2} (horas)	Via de eliminação	Comentários
Venlafaxina	≈ 4 (referente ao composto original, pois o seu metabolito activo (<i>O</i> -demetilvenlafaxina) tem um $t_{1/2}$ elevado (≈10horas).	Metabolismo hepático (metabolito activo); pequena excreção renal na forma de fármaco inalterado (4,7%).	Extensivo metabolismo de 1ª passagem após administração oral.

1.8.4. EFEITOS ADVERSOS

De um modo geral, as reacções adversas mais comuns são: náuseas, cefaleias, insónias, sonolência, tonturas e hipertensão, xerostomia, astenia, irritabilidade, convulsões; aumento das transaminases e do colesterol.^[36] A hipertensão aparece como resultado da inibição da recaptção de NA. Os efeitos indesejáveis na esfera sexual aparentam ser dose-dependentes e parece não haver desenvolvimento de tolerância. Podem ser referidos: diminuição da libido, anorgasmia, atraso ejaculatório e impotência.^[14]

1.9. INIBIDORES DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA/ ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES 2A DE SEROTONINA (SARI)

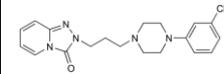
Neste grupo de AD encontra-se a trazodona, um derivado da triazolopiridina, que foi sintetizada, pela primeira vez, em Itália no ano de 1966. Contudo ficou apenas disponível para comercialização no início dos anos 1980 (nos Estados Unidos da América). É considerada como um dos primeiros antidepressivos de 2ª geração, designada, por vezes, de atípica e possui também propriedades farmacológicas e bioquímicas muito específicas e não totalmente compreendidas, o que continua a estimular novas pesquisas.

Devido à sua eficácia antidepressiva e efeito ansiolítico encontra-se entre os AD mais prescritos, apresentando-se como uma alternativa para doentes intolerantes aos efeitos anticolinérgicos dos clássicos TCA. [37]

1.9.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

A tabela que se segue (tabela 13) descreva as principais propriedades físico-químicas associadas à trazodona.

Tabela 13 - Estrutura química e características físico-químicas da trazodona.

Antidepressivo	Estrutura química	Peso molecular (g/mol)	Aspecto	Solubilidade	pKa (25°C)
Trazodona		371,9	Cristais.	Solúvel 1 em 50 de etanol e metanol; muito solúvel em acetona e benzeno; ligeiramente solúvel em éter.	9,8

1.9.2. MECANISMO DE ACÇÃO

O mecanismo de acção postulado para a trazodona é pouco consensual entre a bibliografia publicada devido à sua natureza complexa. A trazodona é um bom exemplo de um fármaco multifuncional dose-dependente na psicofarmacologia. Se administrada em doses baixas actua via mecanismos vinculativos mais potentes. A acção, considerada mais potente, manifestada por este fármaco, é o antagonismo ao nível dos receptores 5-HT_{2A}. No entanto, com doses

altas desempenha acções farmacológicas adicionais. Com doses elevadas podem considerar-se clinicamente relevantes as acções que exerce na extensão de bloqueio dos transportadores de serotonina (SERT), nos receptores 5-HT_{2C} e nos receptores α -2 adrenérgicos. Sabe-se ainda que a sua acção no bloqueio dos SERT, responsáveis pela recaptação da serotonina, é 100 vezes inferior relativamente à sua capacidade para bloquear os receptores 5-HT_{2A}. Devido ao seu perfil multifuncional a trazodona é categorizada como SARI. [38]

O metabolito activo meta-clorofenil-piperazina (mCPP) também apresenta algum grau de actividade serotoninérgica pós-sináptica. [14] Este composto tem uma elevada afinidade por um certo número de receptores de 5-HT, incluindo 5-HT_{2C} > 5-HT₃ > 5-HT_{2A} > 5-HT_{1B} > 5-HT_{1A} > 5-HT_{1D}, nos quais a sua função é maioritariamente como agonista. A acção deste metabolito pode, teoricamente, diminuir o antagonismo directo da trazodona sobre os receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}. Contudo, os níveis plasmáticos e cerebrais de mCPP parecem representar menos de 10% do composto de trazodona original. [38]

1.9.3. FARMACOCINÉTICA

A trazodona é bem absorvida pelo tracto gastrointestinal e se ingerida durante as refeições, ou imediatamente após as mesmas, pode haver aumento na quantidade absorvida, redução na concentração máxima e aumento no tempo necessário para atingir o pico plasmático. Em geral os picos plasmáticos são atingidos em 2 horas. Apresenta elevada ligação às PP (cerca de 90%) e sofre hidroxilação hepática. [14] Estudos realizados *in vitro* em microssomas hepáticos humanos demonstraram que a trazodona é metabolizada num metabolito activo, mCPP pelo citocromo P 450 (CYP3A4). [39] O seu t_{1/2} pode variar entre 6 e 11 horas, ou então entre 4 e 8 horas dependendo da fonte de estudo encontrada (tabela 14).

Tabela 14 - Características farmacocinéticas da trazodona. [27]

Fármaco	T _{1/2} (horas)	Via de eliminação	Comentários
Trazodona	4-8	Metabolismo hepático; pequena excreção renal na forma de fármaco inalterado (< 1%).	O t _{1/2} encontra-se prolongado nos idosos (6-16 horas).

1.9.4. EFEITOS ADVERSOS

Os efeitos colaterais mais frequentes são: sedação, hipotensão ortostática, tonturas, cefaleia, náuseas e sensação de boca seca. As reacções alérgicas e a irritação gástrica podem também estar presentes. Alguns relatos de situações sugerem uma possível ligação entre a trazodona e o aparecimento de arritmias em doentes que já apresentavam contracções ventriculares prematuras ou pró-lapso de válvula mitral. A trazodona está associada à ocorrência de priapismo (erecção peniana prolongada na ausência de estímulo). Outras disfunções sexuais também podem aparecer. ^[14]

1.9.5. SOBREDOSAGEM

Os sintomas mais frequentemente observados são: sonolência, vertigens e vômitos, estando também descritos casos de taquicardia, cefaleias e coma. Não existe antídoto específico para a trazodona. ^[39]

2. MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DOS FÁRMACOS DE ESTUDO

A monitorização terapêutica dos fármacos (TDM) consiste num instrumento válido para otimizar a farmacoterapia na área da Psiquiatria, visto que, actualmente mais de 100 fármacos psicoactivos estão disponíveis. No entanto, apesar das vantagens que têm associadas, o seu uso na prática clínica está longe de ser considerado óptimo. ^[22] São diversificadas as indicações para a aplicação de TDM, incluindo: início de tratamento, alterações de dose, ocorrência de efeitos adversos indesejáveis, ausência de efeito terapêutico, controlo da *compliance*, interacções farmacocinéticas, programas de farmacovigilância, tratamentos combinados (polimedicação), particularidades genéticas envolvidas no metabolismo dos fármacos, tratamentos profiláticos, populações especiais, como as crianças e idosos e psiquiatria forense. ^[22,40]

Até ao momento, entre as diversas classes de AD, o uso da TDM tem sido estabelecido de forma particularmente bem sucedida para os TCA, uma vez que, respondem aos requisitos necessários para que seja exequível a sua monitorização: índice terapêutico estreito e relações de concentração plasmática-resposta terapêutica previamente determinadas. ^[16] De uma forma geral quando se carece de estudos que definam os intervalos terapêuticos, os intervalos-alvo devem consistir nas concentrações plasmáticas que são, normalmente, observadas com doses terapêuticas. Tal intervalo-alvo é então estabelecido de acordo com

uma avaliação de literatura que manifeste forte evidência. No entanto, na realidade, as concentrações plasmáticas ótimas podem diferir amplamente dos intervalos estabelecidos, dependendo das características clínicas de cada doente. É por isso, estritamente necessário, que haja a contextualização da situação para se optar de forma consciente por uma estratégia terapêutica adequada. [22] De forma a resumir a informação sobre os intervalos terapêuticos para cada fármaco em estudo é apresentada a tabela 15.

Tabela 15 - Intervalos-alvo com as respectivas concentrações plasmáticas dos fármacos a analisar. [22]

Fármaco	Intervalo terapêutico recomendado (ng/mL)	Nível de recomendação ¹
Amitriptilina	80 - 120	1
Clomipramina	175 - 450	1
Maprotilina	125 - 200	3
Fluoxetina	120 - 300	3
Sertralina	10 - 50	3
Venlafaxina	195 - 400	2
Trazodona	650 - 1500	3

1 - Nível de recomendação:

- 1: fortemente recomendado;
- 2: recomendado;
- 3: útil;
- 4: provavelmente útil;
- 5: não recomendado.

Ao contrário dos TCA, os SSRI não se encaixam no perfil de fármacos que requerem TDM para a sua utilização segura e eficaz. Isto deve-se, principalmente, à sua ampla janela terapêutica e à sua apresentação gráfica dose - resposta antidepressiva que atinge, a partir de uma certa concentração, um *plateau*, querendo com isto dizer que, o aumento das doses não é acompanhado com o aumento da resposta. No entanto, nos tratamentos em que não haja resposta, a TDM pode ajudar a determinar se o doente está a desenvolver níveis plasmáticos do fármaco substancialmente menores do que o esperado, de forma a tentar um aumento da dose antes de concluir que o doente não responde ao SSRI em questão. Assim sendo, tem-se verificado que a utilidade da TDM para avaliar a *compliance* do uso de SSRI pode ser uma aplicação favorável, com a exceção da fluoxetina. Isso acontece porque, devido aos longos $t_{1/2}$ da fluoxetina e do seu metabolito, ter-se-ia que estar perante um incumprimento enorme para a TDM o detectar. [20] Existe evidência de um benefício económico de TDM para o citalopram, sertralina e paroxetina, apesar de a relação concentração plasmática/efeito terapêutico permanecer pouco clara. [41] Já em relação aos TCA em geral, existem estudos que concluem poupanças significativas aquando da aplicação da TDM na terapêutica com os mesmos. [22]

Não existem dados substanciais para sugerir a utilidade da TDM com o uso de trazodona. O metabolito da trazodona, o mCPP, pode alcançar níveis plasmáticos mais elevados do que o composto original e os estudos sobre a relação níveis plasmáticos-resposta da trazodona e do metabolito mCPP ainda não foram registados. Acredita-se que o metabolito não contribui significativamente para as propriedades antidepressivas do composto original.

A venlafaxina tem uma farmacocinética linear e o seu metabolito activo contribui para os efeitos farmacológicos do composto original. Estes dados, combinados com a curva dose-resposta ascendente, sugerem um potencial para relacionar a concentração plasmática do fármaco com a sua eficácia. Embora a venlafaxina pareça não estar associada a toxicidade mortal, considerando a faixa de dosagem recomendada ampla, a TDM pode fornecer alguma utilidade no sentido de se tentar maximizar o seu benefício enquanto AD. [20]

Na prática clínica, o tempo de colheita mais apropriado para a maior parte dos fármacos psicoactivos é uma semana após a estabilização da dose diária, e imediatamente antes da ingestão da dose matinal, isto é, 12-16 horas após a última toma. A TDM, geralmente, é realizada usando amostras de plasma ou soro, enquanto a análise do sangue total tem vindo a ser cada vez menos utilizada. [22]

Sabe-se ainda que é relevante determinar o limite inferior de quantificação (LLOQ) próximo da gama ng/mL, de forma a ser possível discriminar concentrações plasmáticas baixas. [42]

Apesar do índice terapêutico alargado que caracteriza muitos dos AD recentemente introduzidos no mercado, as aplicações potenciais da TDM à farmacoterapia antidepressiva são significativas. [20] Do ponto de vista económico, um grupo de investigadores sueco provou que a TDM é custo-efectiva nos doentes idosos que fazem terapêutica com os novos AD. O grupo de cientistas apontou ainda para uma redução de 10% das despesas directas com o custo da medicação. Tal foi possível, uma vez que, a TDM possibilitou uma redução na dosagem administrada com eficácia clínica sustentada. [22]

No âmbito da monitorização dos fármacos em estudo no presente trabalho, é importante estabelecer as respectivas doses tóxicas e letais (tabela 16). A mesma vai incluir dados sobre a dotiepina e a nortriptilina, uma vez que, os mesmos serão objecto de avaliação na componente prática deste trabalho. A dotiepina foi incluída, uma vez que, sendo um TCA, parte da informação acerca da mesma já está descrita neste trabalho. Quanto à nortriptilina, a sua selecção para a inclusão no estudo prático deve-se essencialmente à particularidade de ser um AD e simultaneamente metabolito da amitriptilina.

Tabela 16 - Doses terapêuticas, tóxicas e letais dos antidepressivos em estudo. [43]

Antidepressivo	Dose tóxica (µg/mL)	Dose letal (µg/mL)
Amitriptilina	-	-
Nortriptilina	0,25 - 0,5	1,5 - 2
Clomipramina	0,4*	1 - 2 *
Maprotilina	0,3 - 0,8	1 - 5
Fluoxetina	1,5 - 2	0,9 - 5,0 *
Sertralina	0,29 - 1,6	-
Venlafaxina	1 - 1,5 *	6,6 *
Dotiepina	0,8	5 - 19
Trazodona	4	12 - 15

* Corresponde a valores para o metabolito activo.

3. UTILIZAÇÃO DE PSICOFÁRMACOS EM PORTUGAL

De acordo com o primeiro Estudo Epidemiológico Nacional de Saúde Mental - “Estudo Epidemiológico Nacional de Morbilidade Psiquiátrica: Prevalência, factores de risco, carga social e económica e utilização de serviços” - Portugal é considerado como o país da Europa que apresenta maior prevalência de doenças do foro psicológico. Para além deste aspecto, tem-se verificado um aumento, na última década, da utilização e da despesa dos fármacos usados neste tipo de patologia ao nível do SNS. Isto deve-se, em parte, a algumas das alterações legislativas introduzidas com o objectivo de melhorar a acessibilidade a este tipo de fármacos.

A análise do consumo de psicofármacos (ansiolíticos, sedativos, hipnóticos, AD e antipsicóticos) efectuada através de um estudo, que avaliou dados de consumo entre 2000 e 2009), realizado pelo Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (Infarmed) reflecte um aumento da utilização dos mesmos, sendo este mais evidente no caso dos AD e antipsicóticos. Concluiu-se também que no início do estudo, ano 2000, era a fluoxetina a substância com maior consumo. No entanto, esse lugar foi sendo ocupado pelo aumento acentuado da utilização da sertralina e do escitalopram, o que responsabilizou estes 2 fármacos por cerca de 55% do crescimento deste subgrupo terapêutico (tabela 17).

Tabela 17 - Evolução dos encargos do Sistema Nacional de Saúde com antidepressivos entre 2000 e 2009. ^[44]

Antidepressores	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	Var. 2000-09	Peso na Variação
Escitalopram	-	-	-	643.036	4.398.135	6.184.043	9.350.435	12.000.898	17.424.671	20.397.184	3072%	37%
Sertralina	2.406.775	3.481.227	6.438.094	8.663.696	10.140.121	10.041.991	11.229.053	12.251.475	12.034.389	11.105.420	361%	16%
Venlafaxina	3.211.549	4.271.097	8.265.728	10.001.877	11.891.894	14.264.953	14.030.651	10.297.515	10.527.156	10.324.316	221%	13%
Fluoxetina	9.154.200	11.045.653	16.318.935	15.360.638	16.093.815	15.132.018	13.865.097	12.734.267	11.702.461	10.080.298	10%	2%
Paroxetina	5.605.843	7.250.524	12.782.836	13.143.657	12.481.103	11.519.075	10.436.185	9.490.457	8.790.062	7.791.801	39%	4%
Duloxetina	-	-	-	-	-	-	9.361	1.749.274	4.038.114	5.571.173	59415%	10%
Mirtazapina	1.376.815	2.013.810	4.060.317	4.841.782	5.191.524	5.713.889	5.803.847	5.470.067	5.320.977	5.140.119	273%	7%
Trazodona	954.867	1.214.270	1.841.632	2.342.763	3.259.493	3.720.340	4.065.199	4.277.378	4.792.883	5.084.381	432%	7%
Bupropiom	-	-	-	-	70	159	217	60.965	1.085.770	2.119.247	3027396%	4%
Restantes DCIs	6.522.657	7.210.562	10.553.959	10.799.136	10.433.495	10.123.974	9.342.369	8.208.662	7.560.222	6.905.628	5,87%	0,69%
Total	29.232.706	36.487.143	60.261.502	65.796.586	73.889.649	76.700.441	78.132.414	76.540.958	83.276.704	84.519.585	189,13%	100,00%
Taxa média de participação	51%	56%	66%	68%	68%	68%	66%	64%	67%	69%		

No que respeita à despesa com este subgrupo, verificou-se que os encargos do SNS apresentaram um crescimento bastante elevado, em igual período de estudo, sendo o principal responsável por esta variação o escitalopram, seguido da sertralina e venlafaxina. A distribuição geográfica do consumo de AD destaca Évora e Portalegre pelo elevado consumo, e Bragança e Vila Real pelo consumo mais baixo.

De uma forma sucinta este estudo mostra um crescimento notório da utilização e da despesa com os AD. São várias as possíveis explicações para tal condição, nomeadamente uma utilização mais prolongada destes fármacos, a aprovação de novas indicações terapêuticas, uma melhor taxa de diagnóstico e o aumento da acessibilidade aos mesmos. ^[44]

4. DETERMINAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS EM MATRIZES BIOLÓGICAS

A preparação das amostras para que possam ser introduzidas num sistema analítico é um procedimento crucial na análise química moderna, representando a maior parte do trabalho e custo do laboratório. De facto, a presença de interferentes na matriz pode mascarar ou interferir com a análise dos compostos de interesse, pelo que devem ser eliminados ou minimizados pela preparação da amostra, originando cromatogramas mais limpos. Por outro lado, a vida dos equipamentos analíticos (nomeadamente as colunas cromatográficas) é prolongada pelo uso de amostras mais limpas, gastando-se menos tempo na sua manutenção. ^[45] Existem diversas técnicas de extracção, destacando a extracção líquido-líquido (LLE), a extracção em fase sólida (SPE), as mais recentemente introduzidas denominadas de técnicas em miniatura, como por exemplo, a microextracção em fase sólida (SPME), a microextracção em seringa empacotada (MEPS), a microextracção em tubo, a extracção por absorção com barra de agitação (SBSE), entre outras.

Visto que o trabalho incide sobre a técnica de extracção em fase sólida apresenta-se de seguida uma breve abordagem sobre a mesma, de forma a facilitar a sua compreensão.

4.1. INTRODUÇÃO À EXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

A SPE foi introduzida em meados dos anos 70. ^[45] Hoje em dia, esta técnica é uma das ferramentas mais poderosas e mais utilizadas para a extracção e pré-concentração de analitos presentes em matrizes complexas. ^[46] Com a SPE, muitos dos problemas associados à LLE podem ser prevenidos, tais como, separações de fase incompletas, recuperações quantitativas a menos, uso de vidros especiais caros e frágeis e disposição de elevados volumes de solventes orgânicos. Trata-se de uma técnica eficiente que apresenta extracções quantitativas mais facilmente realizáveis, é rápida e pode ser totalmente automatizada. Ainda, o uso de solventes é reduzido, bem como o tempo de laboratório. ^[47] Nesta técnica, os materiais adsorventes dependem das características do pKa dos compostos analisados. ^[21]

O objectivo principal da SPE é a remoção do analito a partir da matriz em que se encontra, eliminando no mesmo processo interferentes da matriz (substâncias proteicas, sais, ureia, ácidos gordos, etc) e a sua posterior concentração num pequeno solvente adequado à análise cromatográfica. [45]

A SPE possibilita a separação de compostos de interesse das impurezas de 3 formas diferentes: extracção selectiva, lavagem selectiva e eluição selectiva. [47]

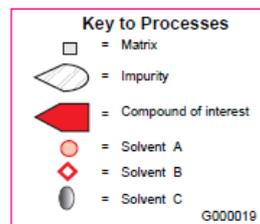


Figura 3 - Equivalentes usados nos esquemas seguintes. [47]

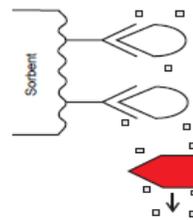


Figura 4 - Extração selectiva. [47]

Extracção selectiva: Implica a selecção de um adsorvente que se liga selectivamente aos componentes da amostra - tanto aos compostos de interesse como às impurezas da amostra. Os compostos seleccionados são retidos quando a amostra passa pela coluna (tubo ou disco). Posteriormente, são recolhidos através de eluição, ou rejeita-se a coluna que contém as impurezas extraídas. [47]

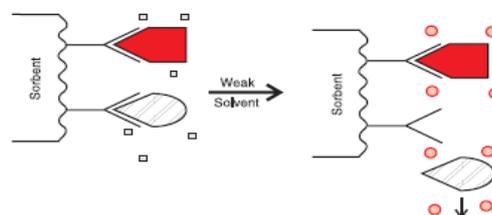


Figura 5 - Lavagem selectiva. [47]

Lavagem selectiva: Os compostos de interesse e as impurezas são retidos na coluna de SPE quando a amostra passa pela mesma; as impurezas são lavadas através de soluções de lavagem que são fortes o suficiente para as remover, mas suficientemente fracas para deixar os compostos de interesse retidos. [47]

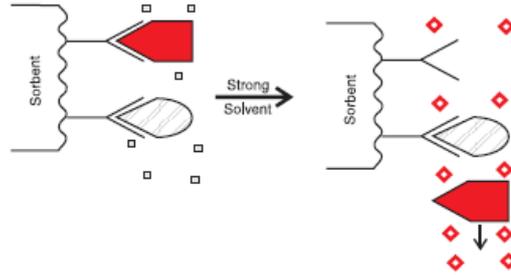


Figura 6 - Eluição selectiva. [47]

Eluição selectiva: Os compostos de interesse adsorvidos são eluídos por um solvente que deixa as impurezas retidas fortemente. [47]

Em geral, os procedimentos da SPE contêm 5 etapas: i) activação do adsorvente de forma a permitir que os sítios activos fiquem disponíveis; ii) acondicionamento do adsorvente com o solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com um solvente da amostra; iii) introdução da amostra, onde ocorre a retenção do analito e, às vezes, de alguns interferentes; iv) limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito; v) eluição e recolha do analito. [46]

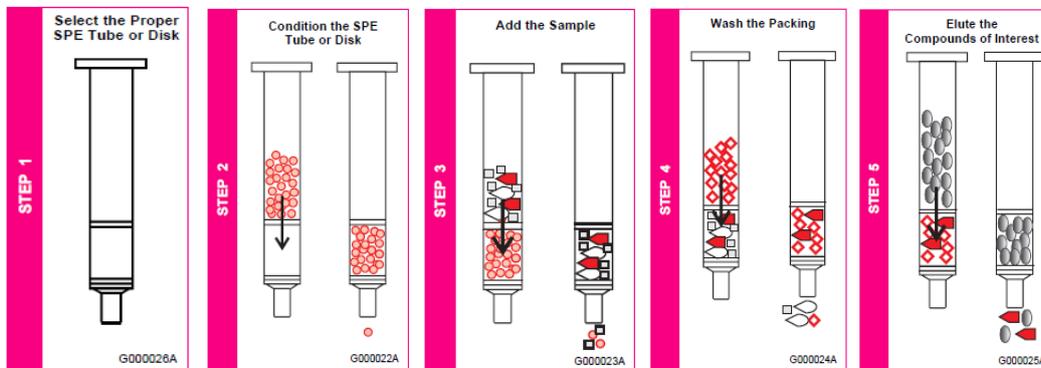


Figura 7: As 5 etapas que envolvem o procedimento de extracção em fase sólida. [47]

Ainda existem 4 tipos de mecanismos extractivos: fase reversa, fase normal, troca iónica e exclusão molecular. O modo de separação mais utilizado na SPE é o de fase reversa, em que a fase estacionária utilizada é apolar, isto é, as partículas adsorventes são hidrofóbicas, como por exemplo, a sílica ligada a grupos octadecilsilano (C_{18}) e octilsilano (C_8)²⁸. Os solventes de eluição são em regra polares como por exemplo, o metanol ou acetonitrilo. [45] Este tipo de separação implica uma fase móvel polar ou moderadamente polar, sendo que o analito de interesse a ser recuperado é, de uma forma geral, medianamente polar ou apolar. [47]

Na SPE de fase normal, a fase estacionária é polar (exemplos: albumina e alguns tipos de sílica gel, florissil, cianopropilsilano, aminopropilsilano). A eluição dos analitos é favorecida com a utilização de solventes apolares que permitam a quebra das ligações entre o grupo funcional do composto e a superfície da fase estacionária. ^[45] Recorre-se a esta técnica quando o analito de interesse tem natureza polar. ^[47]

Na SPE de troca iónica, as partículas sólidas do adsorvente contêm grupos funcionais de troca aniónica ou catiónica responsáveis pelas interações electrostáticas que ocorrem entre os compostos iónicos, ou susceptíveis de sofrerem ionização, e o adsorvente com um grupo funcional de carga oposta. Soluções ácidas, básicas, ou tampões de força iónica elevada, constituem os solventes de eluição.

Na SPE por exclusão molecular o mecanismo de separação baseia-se na dimensão do analito, nas dimensões dos poros da fase estacionária e na capacidade das suas moléculas para penetrarem nos poros.

Existem métodos com a combinação de fases estacionárias de fase reversa e de troca iónica. Este tipo de SPE denomina-se modo misto. ^[45] De facto foi este o mecanismo seleccionado para a realização deste trabalho.

5. MÉTODOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS EM PLASMA

Vários métodos para a determinação de AD em amostras biológicas têm vindo a ser utilizados ao longo do tempo, surgindo cada vez mais novas técnicas de extracção e/ou identificação. De facto, as metodologias utilizadas para a determinação destas substâncias são muito vastas, desde técnicas muito simples como reacções colorimétricas, espectroscópicas, até técnicas mais complexas como os imunoensaios ou a eletroforese capilar. No entanto, as técnicas mais utilizadas foram, são e serão as técnicas cromatográficas. ^[45] A técnica de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), cuja aplicação foi apresentada, pela 1ª vez, em 1975 reúne elevada versatilidade, simplicidade na preparação de amostras, e uma ampla gama de detectores aos quais se pode associar. Desta forma, o HPLC é considerado como o método de eleição para a TDM dos antidepressivos. ^[15] A desvantagem articulada às técnicas cromatográficas diz respeito à necessidade de preparação da amostra antes da separação cromatográfica. Contudo, tal aspecto negativo pode ser melhorado pela preparação de amostras de forma automatizada. ^[22]

Para ter uma maior percepção das técnicas de doseamento de AD em plasma, foi efectuada uma revisão bibliográfica relativamente às técnicas analíticas e aos procedimentos de extracção utilizados para a determinação de amitriptilina, clomipramina, maprotilina, fluoxetina, sertralina, venlafaxina e trazodona em plasma. A tabela 18 apresenta de forma sucinta os dados mais importantes, fulcrais à posterior contextualização dos resultados do trabalho em questão. Esta pesquisa foi efectuada na base de dados pública Pubmed, tendo sido esta limitada a artigos científicos publicados desde o ano 2001 até 2010. As palavras-chave utilizadas nesta pesquisa foram as seguintes:

- *Determination of antidepressants in plasma;*
- *Determination of antidepressants and biological fluids;*
- *Antidepressants and chromatography;*
- *Antidepressants and HPLC;*
- *Antidepressants and LC;*
- *Antidepressants and GC;*
- *Antidepressants extraction;*
- *Analytical determination of antidepressants.*

Tabela 18 - Métodos analíticos para a determinação de antidepressivos em plasma.

Referência	Analito (s)	Amostra (quantidade)	Técnica de preparação da amostra	Sistema cromatográfico e de detecção		LOD/LOQ	Recuperação
Sutherland <i>et al.</i> (2001) [2]	FLU	Plasma	LLE	LC	MS/MS	n.d. / 0,15 ng/mL	96 %
Molander <i>et al.</i> (2001) [2]	FLU	Plasma	SPE	nLC	UV/DAD	n.d. / 0,05 - 0,26 mmol/L	n.d.
Matoga <i>et al.</i> (2001) [2]	VEM	Plasma	LLE	HPLC	UV/DAD	n.d. / 50 ng/mL	85 %
Palego <i>et al.</i> (2001) [2]	CLO	Plasma (1mL)	SPE	HPLC	UV/DAD	10 µg/L / 25 µg/L	72 %
Llerena <i>et al.</i> (2003) [2]	FLU	Plasma (500µL)	LLE	HPLC	UV/DAD	10nmol/L / 14 nmol/L	87 %
Cantú <i>et al.</i> (2004) [2]	AMI	Plasma	LLE	CE	NACE-UV	30 ng/mL / 50 ng/mL	75 %
Chen <i>et al.</i> (2004) [2]	AMI	Plasma	LLE	CE	CZE-UV	2,0 ng/mL / n.d.	64,7 %
Juan <i>et al.</i> (2005) [48]	FLU;VEM	Plasma (0,5 mL)	SPE	LC	MS	0,5 ng/mL / n.d (FLU); 0,1 ng/mL /n.d (VEM)	> 95 %
Vvlase <i>et al.</i> (2005) [2]	FLU	Plasma (1mL)	LLE	HPLC	FD	0,4 ng/mL / 1,0 ng/mL	92,6 %
Djordjevic <i>et al.</i> (2005) [2]	FLU	Plasma (1mL)	LLE	LC	MS	1 µg/mL / 2,5 µg/mL	89,7 - 96,6 %
Kovacevic <i>et al.</i> (2006) [2]	FLU	Plasma (1mL)	LLE	HPLC	FD	n.d. / 20 µg/L	90,75 - 94,48 %
Shinozuka <i>et al.</i> (2006) [49]	AMT; MAP;TRZ	Plasma (1mL)	SPE	LC	MS	0,03-0,63 µg/mL / 0,10-1,0	69 - 102 %

						µg/mL	
Mandrioli <i>et al.</i> (2006) [50]	SER	Plasma (0,25 mL)	SPE	HPLC	UV	2,5 ng/mL / 7,5 ng/mL	> 94 %
Chaves <i>et al.</i> (2007) [51]	SER; FLU; AMT	Plasma (1 mL)	SBSE	LC	UV	n.d. / 10,0 - 40,0 ng/mL	52 - 110 %
Fernandes <i>et al.</i> (2007) [52]	FLU	Plasma (1 mL)	SPME	HPLC	UV	n.d. / 25 ng/mL	1,94 - 10,54 %
Wilson <i>et al.</i> (2007) [15]	AMT; FLU; SER; CLO	Plasma (1 mL)	LLE	HPLC	UV	n.d./5ng/mL para a AMT; n.d./ 10ng/mL para a FLU, SER e CLO	86,3 % para a AMT; 73,6 % para a FLU; 80,1% para a SER; 83,1 % para a CLO
Mandrioli <i>et al.</i> (2007) [2]	VEM	Plasma (250 µL)	SPE	HPLC	FD	0,3 ng/mL / 1,0ng/mL	92 %
De Castro <i>et al.</i> (2007) [2]	AMI; TRZ; SER; VEM; CLO; FLU	Plasma (50 µL)	SPE	LC	MS	0,5 µg/L / 10 µg/L (TRZ, VEM, CLO e AMI); 1µg/L / 10µg/L (FLU, SER)	99 %
Liu <i>et al.</i> (2007) [2]	VEM	Plasma (0,5 mL)	LLE	LC	MS	0,4 ng/mL / 3,5 ng/mL	77 %
Wille <i>et al.</i> (2007) [2]	VEN; TRZ; FLU; MAP	Plasma (1mL)	SPE	GC	MS	n.d. / 5-12,5 ng/mL e 1-6,25 ng/mL	72 - 134 %
Musenga <i>et al.</i> (2007) [2]	SER	Plasma (500µL)	SPE	CE	LIF	1,5 ng/mL / n.d.	97,1 %
Mercolini <i>et al.</i> (2008) [2]	TRZ	Plasma (250 µL)	SPE	HPLC	UV/DAD	4 ng/mL / 10 ng/mL	93 %
Christian <i>et al.</i> (2008) [53]	FLU	Plasma (1 mL)	SBSE	GC	MS	10 pg/mL / 30 pg/mL (utilizando SOLVENT DESORPTION) 0,46 pg/mL / 1,37 pg/mL (utilizando THERMAL DESORPTION)	75.5 %
Silva <i>et al.</i> (2008) [54]	FLU; SER	Plasma (0,5 mL)	SPME	LC	UV	5 - 20 ng/mL / 20 - 50 ng/mL	5,3 - 43,5 %
Patel <i>et al.</i> (2008) [55]	VEM	Plasma (0,2 mL)	LLE	LC	MS/MS	n.d. / 2,0 ng/mL	93,2 - 101 %
Yazdi <i>et al.</i> (2008) [56]	AMT	Plasma (0,5 mL)	DLLME	GC	FID	0,5 ng/mL / n.d.	54,76 - 74,02 %
Patel <i>et al.</i> (2008) [57]	TRZ	Plasma (0,5 mL)	LLE	LC	MS/MS	10,0 ng/mL / n.d.	53,1 %
Patel <i>et al.</i> (2009) [58]	SER	Plasma (0,3 mL)	LLE	LC	MS/MS	n.d. / 0,5 ng/mL	73,7 - 85,7 %
Nora <i>et al.</i> (2009) [59]	VEM; FLU	Plasma	SBSE	HPLC	FD	n.d. / 0,2 ng/mL para a VEM; n.d./ 2 ng/mL para a FLU	50 - 92 %
Daniela <i>et al.</i> (2009) [60]	FLU	Plasma (1 mL)	HF-LPME	HPLC	UV	n.d. / 5ng/mL	70,9 %

Rajasekhar <i>et al.</i> (2009) [2]	VEM	Plasma	LLE	LC	MS	n.d. / 4,0 ng/mL	75,06 %
Qin <i>et al.</i> (2010) [2]	VEM	Plasma	LLE	UPLC	MS/MS	n.d. / 0,2 ng/mL	86,4 %
De Freitas <i>et al.</i> (2010) [2]	FLU	Plasma (1mL)	HF-LPME	HPLC	FD	n.d. / 5 ng/mL	70,9 %

CLO - clomipramina; **CZE** - *capillary zone electrophoretic method* - (método electroforético de zona capilar); **DAD** - *diode-array detector* - (detector de fotodiodos); **DLLME** - *Dispersive liquid-liquid microextraction* - (microextração líquido-líquido dispersiva); **FD** - *fluorescence detection* - (detecção por fluorescência); **FID** - *flame ionization detector* - (detector de ionização de chama); **FLU** - fluoxetina; **GC** - *Gas chromatography* - (cromatografia gasosa); **HF-LPME** - *Hollow fiber-based liquid-phase microextraction* - (microextração de fase líquida baseada em fibra oca); **HPLC** - *High-performance liquid chromatography* - (cromatografia líquida de alta resolução); **LC** - *liquid chromatography* - (cromatografia líquida); **LIF** - *laser-induced fluorescence* - (fluorescência induzida por laser); **LLE** - *liquid-liquid extraction* - (extração líquido-líquido); **MAP** - maprotilina; **MS** - *mass spectrometry* - (espectrometria de massa); **MS/MS** - *tandem mass spectrometry* - (espectrometria de massa em tandem); **NACE** - *non-aqueous capillary electrophoresis* - (electroforese capilar não aquosa); **n.d.** - não detectado; **nLC** - *nano liquid chromatography* - (nanocromatografia líquida); **NOR** - nortriptilina; **SBSE** - *Stir bar sorptive extraction* - (extração com agitação de barra sorptiva/ extração por absorção com barra de agitação); **SER** - sertralina; **SPE** - *Solid-phase extraction* - (extração em fase sólida); **SPME** - *Solid-phase microextraction* - (microextração de fase sólida); **TRZ** - trazodona; **UPLC** - *Ultra performance liquid chromatography* - (cromatografia líquida de ultra *performance*); **UV** - Ultraviolet - (ultravioleta); **VEM** - venlafaxina.



PARTE EXPERIMENTAL

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1. INSTRUMENTAÇÃO

- Sistema de purificação de água Milli-Q Advantage A10® *system* da Millipore;
- Balança analítica da KERN - modelo PLJ 510-3M;
- Vortex Mixer da Labnet International - modelo 230 V;
- Medidor de pH da Metrohm - modelo 744;
- Micropipetas automáticas da Gilson e Eppendorf:
 - 10 µL - DB61802 da Gilson;
 - 100 µL - DL50316 da Gilson;
 - 200 µL - 1029284 da Eppendorf;
 - 1000 µL - BC50246 da Gilson.
- Câmara frigorífica da Dagard - refrigeração a 4°C;
- Sistema de extracção da Waters - modelo WAT200683 (EUA);
- Bomba de vácuo da GAST - modelo DOA-P505-BN (EUA);
- Câmara de congelação da Electrolux - modelo Inspire (Portugal);
- Sistema de ultrasons da Elma - Transonic 460/H (Alemanha);
- Colunas de extracção Oasis® MCX 30mg da Waters (EUA);
- Placa de agitação magnética da Selecta - modelo ASINCRO, J.P. (Espanha);
- *Vial's* de 1.5 mL;
- Tubos de vidro de 10 mL e respectivas tampas, da Schott;
- Balões volumétricos de 5, 10, 100, 250 e 1000 mL.

1.1.2. SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Para a validação do método usou-se um sistema UPLC equipado com um detector de fotodiodos modelo 1290 e um injector automático modelo 1290 da Agilent (Santa Clara CA, EUA). Os compostos foram separados por uma coluna de fase reversa Zorbax 300 SB-C₁₈ (5 µm, 4,6 ×150 mm) da Agilent (Santa Clara, EUA) à temperatura ambiente (25° C).

1.2.3. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As condições cromatográficas foram optimizadas anteriormente a este trabalho. ^[45] Sendo as condições finais as que a seguir se descrevem:

Como fase móvel foi utilizada uma mistura de acetonitrilo com tampão dihidrogenofosfato de potássio 25 mM, na proporção de 40:60 (v:v), em modo isocrático e com um fluxo constante de 1 mL/minuto. O tempo total de corrida cromatográfica foi de 45 minutos. O comprimento de onda (λ) escolhido para a detecção dos analitos foi de 211 nm e o volume de injeção utilizado foi de 2 μ L.

1.2. REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS

- Metanol LiChrosolv®, Merck (Alemanha);
- Acetonitrilo PROLABO®, VWR (Portugal);
- Água desionizada Milli-Q;
- Ácido Clorídrico (HCl) 36,5% *pro analysi*, Carlo Erba (Portugal);
- *n*-Hexano *pro analysi*, J.T. Baker (Holanda);
- Isopropanol *pro analysi*, Sigma Aldrich (Portugal);
- Cloreto de Potássio (KCl), Merck (Portugal);
- Cloreto de Sódio (NaCl), Merck (Portugal);
- Dihidrogenofosfato de Potássio (KH₂PO₄), Sigma Aldrich (Portugal);
- Fosfato de Potássio dibásico (K₂HPO₄), Pancreac (Espanha);
- Hidróxido de sódio (NaOH), Sigma Aldrich (Portugal);
- Hidrogenofosfato dissódico (Na₂HPO₄), Sigma Aldrich (Portugal);
- Amónia, Sigma Aldrich (Portugal);
- Diclorometano, Sigma Aldrich (Portugal);

Os padrões analíticos utilizados foram:

- Cloridrato de amitriptilina, pureza $\geq 98\%$, Sigma Aldrich (USA);
- Cloridrato de nortriptilina, pureza $\geq 98\%$, Sigma Aldrich (USA);
- Cloridrato de clomipramina, pureza $\geq 98\%$, Sigma Aldrich, (USA);
- Cloridrato de maprotilina, pureza $\geq 98\%$, Sigma Aldrich (USA);
- Cloridrato de dotiepina, pureza $\geq 98\%$, LCG - Promochem, (UK);
- Cloridrato de fluoxetina, pureza $\geq 98\%$, Sigma Aldrich, (USA);
- Cloridrato de sertralina, pureza $\geq 98\%$, gentilmente cedido pela Pfizer (USA) e pela Bluepharma (Portugal);
- Cloridrato de trazodona, pureza $\geq 98\%$, Sigma Aldrich (USA);
- Cloridrato de venlafaxina, pureza $\geq 98\%$, Sigma Aldrich (USA);
- Cloridrato de protriptilina, pureza $\geq 98\%$, Sigma Aldrich (USA);

1.3. PADRONIZAÇÃO INTERNA

Na determinação de substâncias em amostras biológicas é comum recorrer-se à adição de uma substância conhecida a uma concentração constante - padrão interno - à amostra, com o objectivo de minimizar as perdas de analito durante o processo extractivo. Esta substância deverá ter características físico-químicas o mais próximas possível dos analitos que se pretendem analisar, para que o seu comportamento durante todo o processo seja semelhante. Deste modo, e sabendo a quantidade de padrão interno adicionada, pode ter-se uma ideia acerca da recuperação do método. Por outro lado, na construção de curvas de calibração é comum usar-se como resposta a razão de áreas cromatográficas entre o(s) analito(s) e o padrão interno, minimizando assim o efeito de eventuais perdas de analito na precisão e exactidão do método.

Sendo assim foi seleccionada a protriptilina, um antidepressivo, como padrão interno (PI), devido ao facto de não ser comercializada em Portugal. Por outro lado, apresenta um bom comportamento cromatográfico e não interfere com os outros antidepressivos nem com as matrizes biológicas utilizadas.

1.4. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES

1.4.1. SOLUÇÕES PADRÃO

As soluções padrão dos antidepressivos em estudo prepararam-se por diluição da substância pura em metanol da forma que a seguir se descreve:

Para balões volumétricos de 5 mL, foram pesados 5 mg de cada um dos padrões (amitriptilina, fluoxetina, sertralina, venlafaxina, maprotilina, trazodona, nortriptilina, dotiepine e clomipramina) e adicionado metanol até perfazer um volume final de 5 mL. Obteve-se assim uma concentração final de 1 mg/mL, sendo esta solução armazenada a 4°C e protegida da luz. A partir desta solução foram efectuadas diluições sucessivas com metanol para obter as soluções de trabalho de 50 e 5 µg/mL.

No caso da protriptilina, a solução de trabalho foi preparada numa concentração de 50 µg/mL. Também esta solução foi armazenada a 4°C ao abrigo da luz.

Refira-se que, foi preparada uma solução a 1 µg/mL para cada um dos compostos. Ao passo que, as restantes soluções são uma mistura de todos os analitos com excepção do padrão interno.

1.4.2. OUTRAS SOLUÇÕES

Tampão dihidrogenofosfato de potássio 25 mM, pH=7.

Para um volume final de 1000 mL foram pesados 1,7g de KH_2PO_4 e 0,291g de NaOH, tendo sido adicionada água Milli-Q até perfazer um volume final de 1000 mL.

Tampão fosfato salino (PBS), pH=7.

Para um volume final de 1000 mL pesaram-se 200 mg de KH_2PO_4 , 200 mg de KCl, 8 g de NaCl e 1,15 g de Na_2HPO_4 , para um balão volumétrico e aferiu-se com água Milli-Q.

Ácido clorídrico 0,1 M.

Para um volume final de 250 mL, mediram-se 2,067 mL de HCl 37%, para um balão volumétrico e aferiu-se com água Milli-Q.

Diclorometano: isopropanol: amónia (78:20:2; v/v)

Para um volume final de 100 mL, adicionaram-se 78 mL de diclorometano, 20mL de isopropanol e 2 mL de amónia.

1.5. MATRIZES BIOLÓGICAS

No presente trabalho foi utilizado como matriz plasma humano. Para tal foram preparadas *pools* com amostras pertencendo a vários indivíduos a partir de excedentes do processo de colheita, do Laboratório de Análises Clínicas, do Centro Hospitalar Cova da Beira. As amostras foram conservadas com refrigeração a 4°C, antes da sua utilização.

1.6. PROCEDIMENTO DE EXTRACÇÃO

Adicionaram-se a 500 μL de amostra 50 μL de padrão interno (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após adição de 8 mL de tampão PBS, pH = 7, a amostra foi vigorosamente agitada durante 30 segundos. O sobrenadante foi então adicionado às colunas de SPE previamente acondicionadas com 2 mL de metanol e 2 mL de água Milli-Q. Após a passagem das amostras as colunas foram lavadas com 2 mL de ácido clorídrico 0,1 M, 2 mL de metanol e 2 mL de hexano. Aquando da passagem da totalidade de amostra por gravidade através das colunas, as mesmas foram então secas sob vácuo total durante 20 minutos. Os analitos foram eluídos com 2 mL de uma solução de diclorometano: isopropanol: amónia (78:20:2; v/v). Por último, os extractos depois

de evaporados a 35°C, sob uma corrente de azoto, foram dissolvidos com 50 µL de fase móvel e 2 µL foram injectados no sistema cromatográfico.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. OPTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE EXTRACÇÃO

O procedimento de extracção foi previamente otimizado num trabalho anterior. [45]

No entanto foi realizada uma comparação entre o comportamento de plasma e tampão PBS, de forma a averiguar se existem diferenças significativas que impossibilitem o uso de tampão PBS em todo o trabalho. Esta situação foi testada por razões económicas, uma vez que, o uso de PBS economiza o trabalho e pelo acesso mais facilitado ao mesmo em relação à amostra de plasma.

No caso do plasma humano, este antes de ser processado foi levado a vórtex, onde permaneceu durante 5 minutos em agitação, seguindo-se a centrifugação durante 5 minutos, a 3500 rpm. Adicionaram-se a 500 µL de plasma 8 mL de tampão PBS, uma mistura de AD e 50 µL de padrão interno (10 µg/mL). Após tal procedimento foi realizada a extracção já descrita anteriormente e consequente injeção no sistema cromatográfico. O mesmo procedimento foi efectuado em relação ao tampão PBS (500 µL de tampão PBS em vez de plasma). Estes ensaios foram efectuados em triplicado a duas concentrações, 5 e 2,5 µg/mL para cada antidepressivo.

Para as duas concentrações, $C_1 = 0,5 \mu\text{g/mL}$ e $C_2 = 2,5 \mu\text{g/mL}$, calcularam-se para cada composto, a área do pico, o desvio-padrão e o coeficiente de variação, obtendo-se em todos os casos inferiores a 17%. Como se pode observar pelos gráficos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, os resultados são similares para o PBS e para o plasma, pelo que, sendo assim optou-se por continuar o presente trabalho com tampão PBS, uma vez que, estes resultados demonstram que a recuperação dos analitos após a extracção é similar.

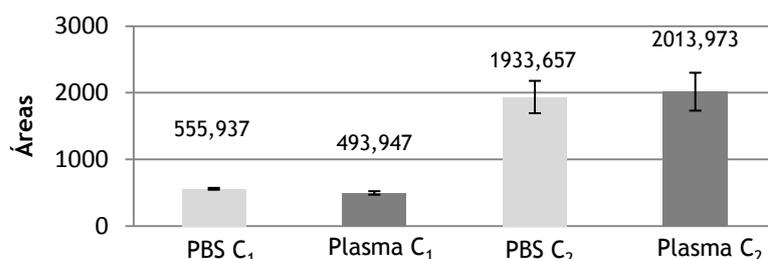


Gráfico 1 - Comparação da área de trazodona obtida em PBS e em plasma.

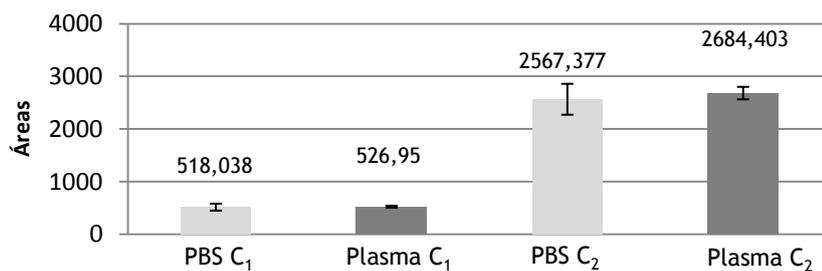


Gráfico 2 - Comparação da área de maprotilina obtida em PBS e em plasma.

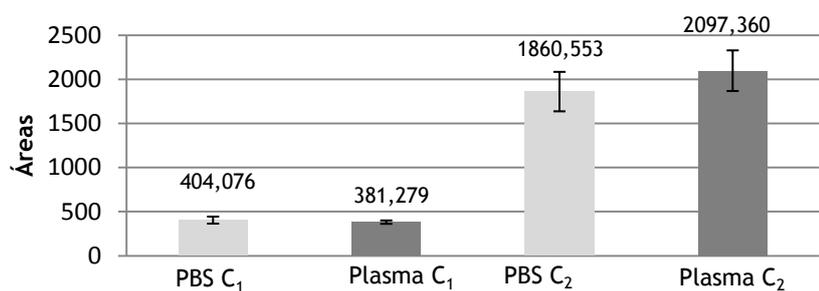


Gráfico 3 - Comparação da área de nortriptilina obtida em PBS e em plasma.

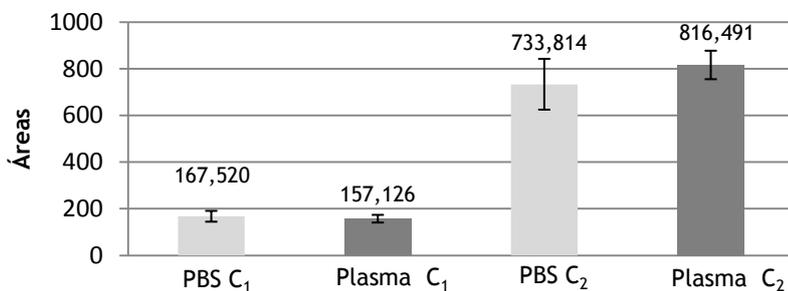


Gráfico 4 - Comparação da área de fluoxetina obtida em PBS e em plasma.

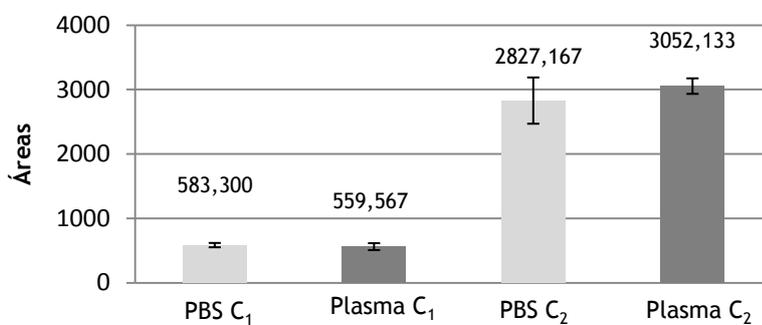


Gráfico 5 - Comparação da área de dotiepinga obtida em PBS e em plasma.

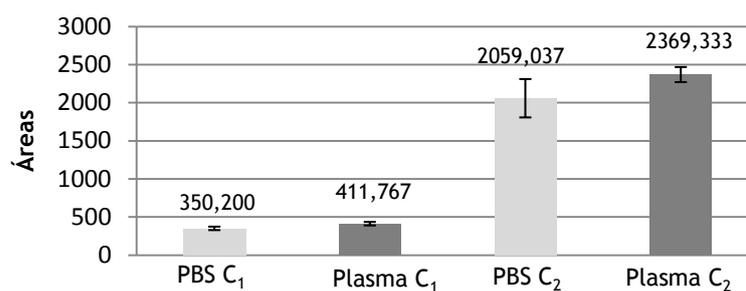


Gráfico 6 - Comparação da área de sertralina obtida em PBS e em plasma.

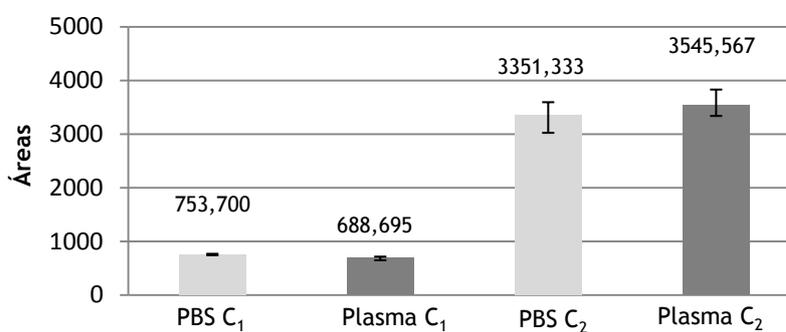


Gráfico 7 - Comparação da área de amitriptilina obtida em PBS e em plasma.

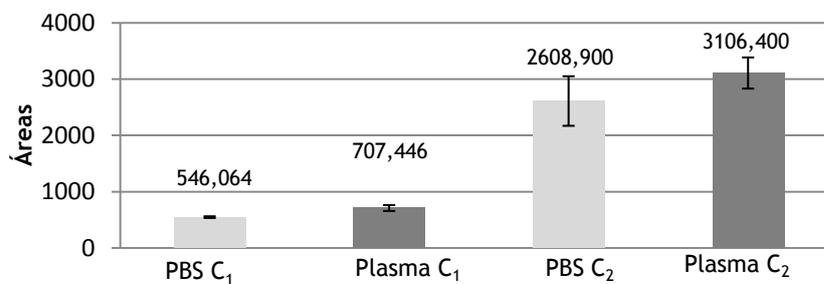


Gráfico 8 - Comparação da área de clomipramina obtida em PBS e em Plasma.

O gráfico que compara o comportamento da venlafaxina em PBS e em plasma não foi incluído nesta sequência de gráficos, porque logo de início através de dados obtidos chegou-se à conclusão de que apenas se podia constatar a presença da mesma na amostra de forma qualitativa. Assim sendo tornou-se impossível determinar a sua quantificação.

2.2. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

As substâncias foram identificadas com base no respectivo tempo de retenção e comprimento de onda máximo. No entanto, escolheu-se para a quantificação o comprimento de onda (λ) de 211 nm, uma vez que todos os analitos absorvem a este λ . (tabela 19)

Na tabela 19 apresentam-se os tempos de retenção para cada um dos compostos estudados, resultando da injeção de 2 μ L, com um fluxo de 1mL/minuto de uma mistura 1 (clomipramina, sertralina e nortriptilina), de uma mistura 2 (venlafaxina, protriptilina, fluoxetina e dotiepina) e de uma mistura 3 (trazodona, maprotilina e amitriptilina). Todos eles encontravam-se a uma C = 1 μ g/mL.

Tabela 19 - Descrição dos tempos de retenção de cada um dos antidepressivos em estudo.

ANALITO	TEMPO DE RETENÇÃO (MINUTOS)
Clomipramina	35,6
Sertralina	21,7
Nortriptilina	13,2
Venlafaxina	4,9
Protriptilina	10,5
Fluoxetina	14,0
Dotiepina	18,2
Amitriptilina	26,4
Maprotilina	12,1
Trazodona	5,2

De seguida serão apresentados os cromatogramas de cada fármaco estudado, indicando o tempo de retenção, resultantes das mesmas condições atrás descritas.

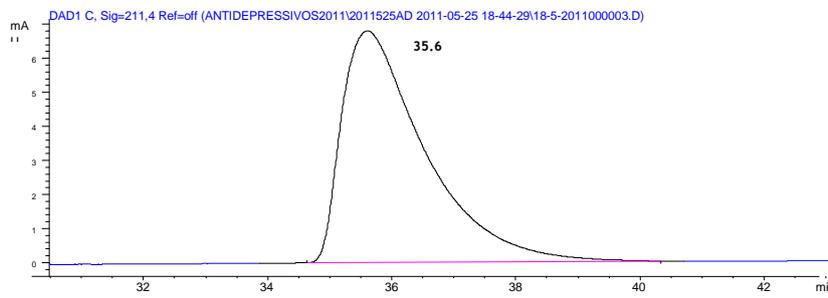


Figura 8 - Cromatograma obtido para a clomipramina (C = 1 μ g/mL).

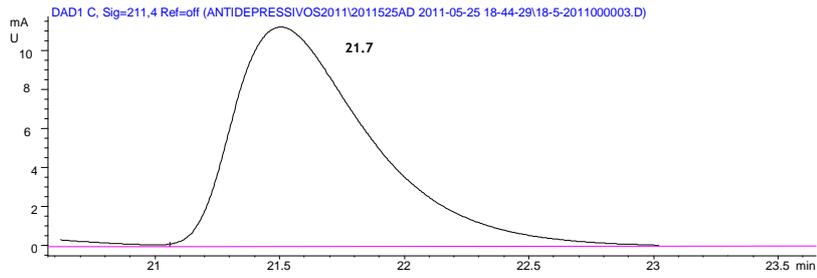


Figura 9 - Cromatograma obtido para a sertralina (C = 1 µg/mL).

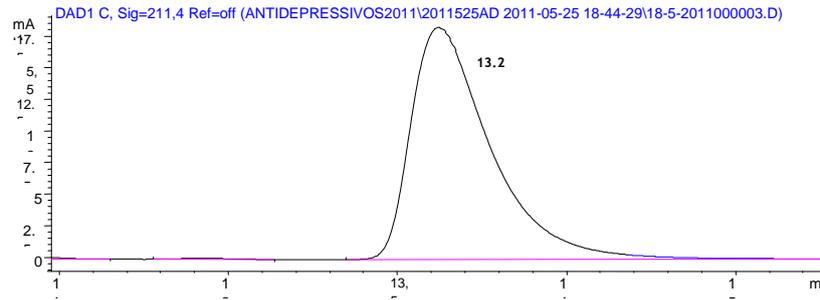


Figura 10 - Cromatograma obtido para a nortriptilina (C = 1 µg/mL).

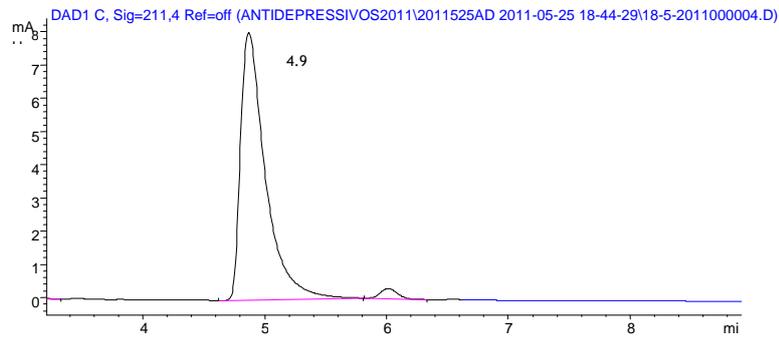


Figura 11 - Cromatograma obtido para a venlafaxina (C = 1 µg/mL).

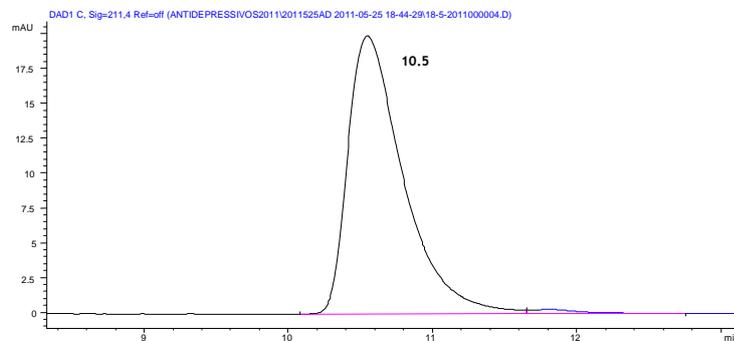


Figura 12 - Cromatograma obtido para a protriptilina (C = 1 µg/mL).

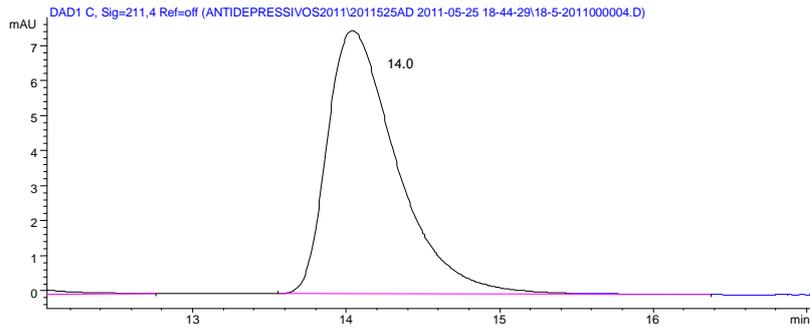


Figura 13 - Cromatograma obtido para a fluoxetina (C = 1 µg/mL).

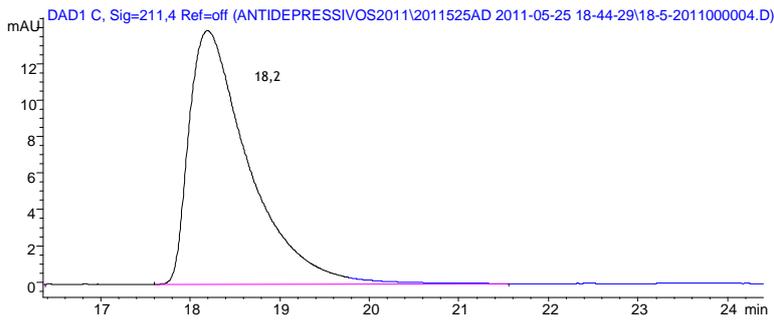


Figura 14 - Cromatograma obtido para a dotiepine (C = 1 µg/mL).

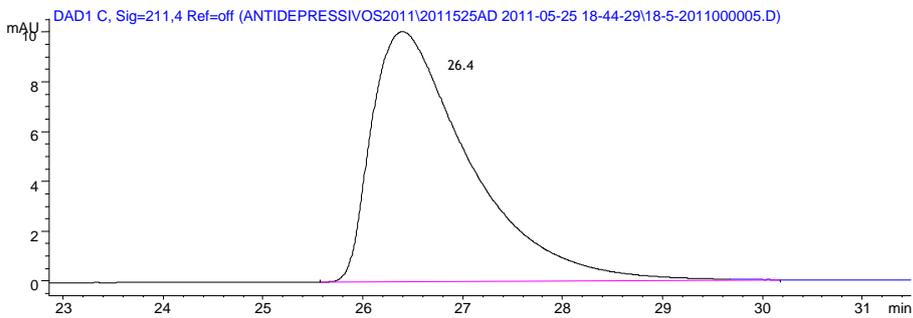


Figura 15 - Cromatograma obtido para a amitriptilina (C = 1 µg/mL).

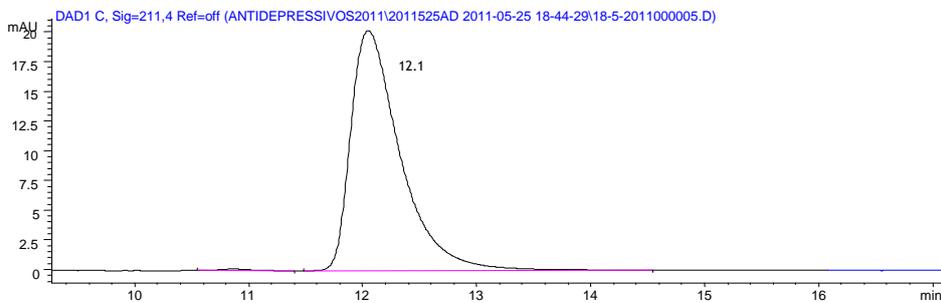


Figura 16 - Cromatograma obtido para a maprotilina (C = 1 µg/mL).

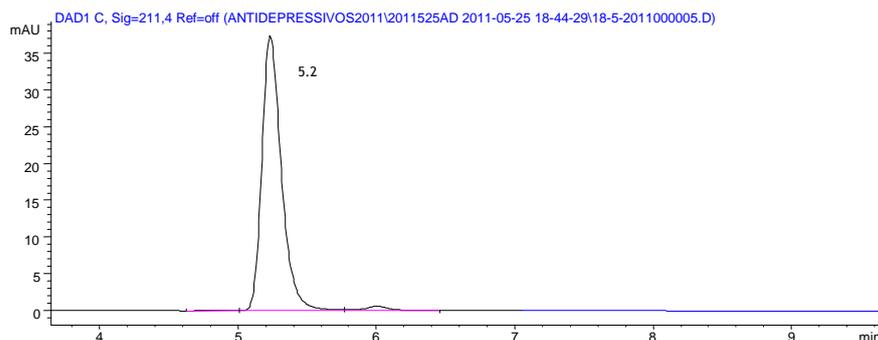


Figura 17 - Cromatograma obtido para a trazodona através (C = 1 µg/mL).

2.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A fiabilidade dos resultados analíticos é de extrema importância em Toxicologia, já que constitui um requisito essencial à correcta interpretação dos resultados. O processo de validação deve incluir todos os procedimentos necessários para demonstrar que uma técnica analítica destinada à determinação quantitativa de um ou mais analitos numa determinada amostra é adequada.

Assim sendo distinguem-se 3 tipos de validação:

VALIDAÇÃO COMPLETA - importante nos seguintes casos: desenvolvimento e implementação de um método bioanalítico pela 1ª vez e para uma nova entidade de um fármaco.

VALIDAÇÃO PARCIAL - consiste em modificações em métodos bioanalíticos já validados. Pode variar numa escala, tratando-se de uma pequena validação no caso de uma determinação de precisão e exactidão intra-análise ou então ser quase completa. Geralmente realiza-se na transferência de métodos bioanalíticos entre laboratórios ou analistas, na alteração dos procedimentos de processamento da amostra, entre outros.

VALIDAÇÃO CRUZADA (CROSS) - trata-se de uma comparação de parâmetros de validação, quando 2 ou mais métodos bioanalíticos são usados para gerar dados dentro do mesmo estudo ou em diferentes estudos. Por exemplo, quando a análise de amostras dentro de um estudo único é conduzida em mais do que um sítio/laboratório, a validação cruzada deve ser realizada em cada sítio/laboratório de forma a estabelecer a confiança interlaboratórios. Também deve ser considerada quando os dados que são gerados usando diferentes técnicas analíticas, em diferentes estudos, são incluídos numa submissão regulamentar. ^[61]

A conformidade da metodologia deve ter alguns parâmetros obrigatórios, tais como selectividade/especificidade, precisão, exactidão, linearidade/curva de calibração, limites de detecção e de quantificação e recuperação. [62] O método descrito foi validado nestes parâmetros seguindo as normas da *Food and Drug Administration* (FDA) e da *International Conference on Harmonisation* (ICH). [61,63]

2.3.1. SELECTIVIDADE/ESPECIFICIDADE

A selectividade é a capacidade que um método analítico tem em diferenciar e quantificar o analito na amostra na presença de outros compostos. [61] Representa o grau de interferência de espécies, como outro princípio activo, reagentes, impurezas e produtos de degradação, garantindo que o pico de resposta seja exclusivamente de um componente simples, isto é, que não existam interferentes naquele tempo de retenção. [62]

Para a avaliação da selectividade, *pools de* amostras brancas da matriz biológica apropriada de diferentes origens foram extraídas pelo procedimento de extracção já anteriormente descrito e analisadas, onde foram pesquisados interferentes aos mesmos tempos de retenção dos analitos e λ .

Através da análise visual dos cromatogramas (figura 18 e 19) nos intervalos de detecção que compreendem o tempo de retenção dos analitos de interesse, consegue-se garantir a ausência de resposta no cromatograma de amostra de plasma branco, o que permite concluir que não foram observadas quaisquer interferências de constituintes da matriz nos tempos de retenção e λ para cada uma das substâncias em estudo.

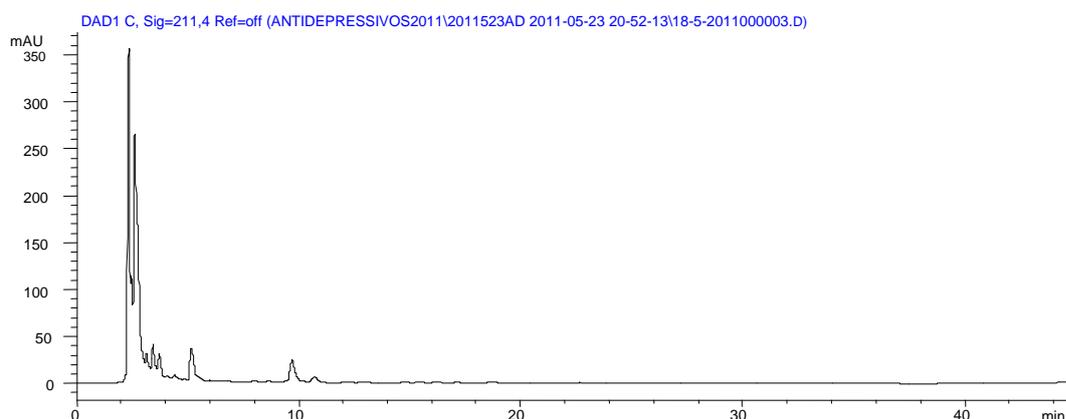


Figura 18 - Cromatograma de amostra de plasma branco.

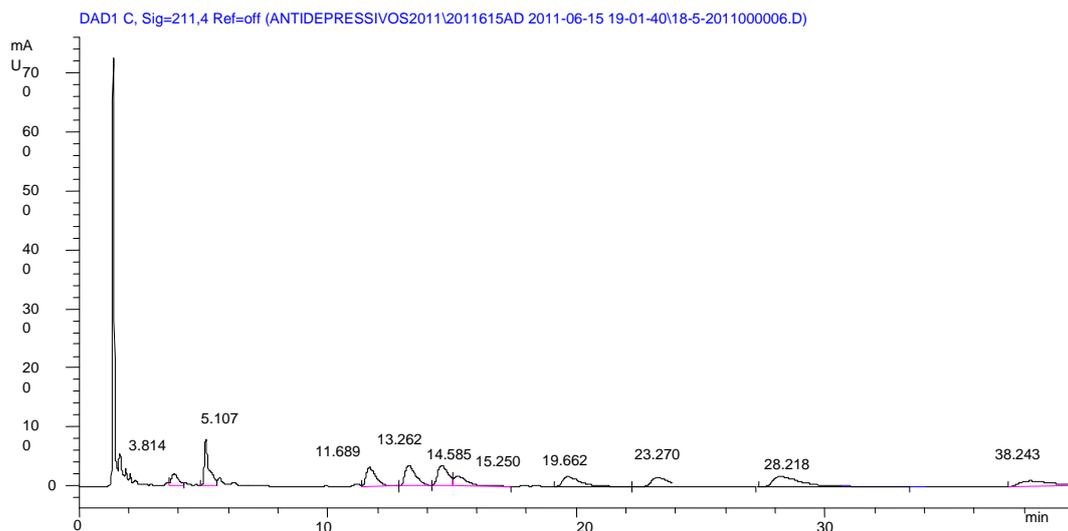


Figura 19 - Cromatograma de amostra de plasma fortificada com os analitos em estudo (C=1 μ g/mL).

Quanto à especificidade, foi avaliada a interferência de outras substâncias susceptíveis de serem utilizadas concomitantemente com a terapêutica antidepressiva.

A tabela 20 resume os resultados obtidos aquando do procedimento de análise cromatográfica de várias substâncias, distinguindo os respectivos tempos de retenção a um λ máximo de absorção de 211 nm.

Tabela 20 - Tempo de retenção para alguns compostos que podem ser usados concomitantemente com antidepressivos.

Fármaco	Tempo de retenção (minutos)
Trimipramina	26,3
Narceína	11,2
Oxcarbamazepina	10,0
Mianserina	16,9
Cetoprofeno	20,4
Fenobarbital	17,1
Cloranfenicol	22,8
Atropina	9,9
Papaverina	11,2
Olanzapina	12,4
Ciamemazina	20,3

Através dos tempos de retenção obtidos para os vários fármacos testados (tabela 20) podemos concluir que a metodologia apresenta especificidade, uma vez que os mesmos não coincidem com os tempos de retenção dos antidepressivos em estudo.

2.3.2. CURVA DE CALIBRAÇÃO E LINEARIDADE

A linearidade trata-se da capacidade de um método analítico produzir resultados que sejam directamente proporcionais à concentração do analito, numa determinada faixa de concentrações. A faixa linear de um método é definida como o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com precisão, exactidão e linearidade exigidas sob as condições especificadas para o ensaio. ^[64]

A curva de calibração traduz a relação que existe entre a resposta do equipamento e as concentrações conhecidas do analito. Deve ser desenvolvida para cada analito na amostra. Para que a relação entre a concentração e a resposta do equipamento seja adequadamente definida deve ser usado um número suficiente de padrões. O número de padrões usados na construção da curva de calibração terá em conta o intervalo antecipado de valores analíticos bem como, a natureza da relação analito/resposta. As concentrações dos padrões serão escolhidas com base no intervalo de concentrações esperadas no estudo em causa. A curva de calibração deve consistir em:

- Amostra branca (sem padrão interno);
- Amostra zero (com padrão interno) e;
- 6-8 amostras não zero que estejam incluídas no intervalo esperado, incluindo o LLOQ.

As seguintes condições devem ser respeitadas no desenvolvimento de uma curva de calibração:

- 20% de desvio padrão e $\pm 20\%$ de erro relativo médio (*BIAS*) no limite inferior de quantificação (LLOQ) da concentração nominal;
- 15% de desvio padrão e $\pm 15\%$ de erro relativo médio (*BIAS*) para os restantes calibradores da concentração nominal.

Pelo menos 4 dos 6 padrões não zero devem cumprir os critérios acima descritos, incluindo o LLOQ e o padrão de calibração com a concentração mais elevada ^[61]

O erro relativo médio é a relação entre as concentrações obtidas e as concentrações teóricas:

$$BIAS = \frac{(Concentração\ calculada - Concentração\ teórica)}{Concentração\ teórica} \times 100 \quad (1)$$

A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efectuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. A equação da recta que descreve uma curva analítica pode ser expressa pela seguinte equação:

$$Y = ax + b \quad (2)$$

onde,

y é a resposta medida (altura ou área do pico);

x é a concentração do analito;

a é o declive da curva de calibração;

b é o coeficiente linear (intersecção da curva com o eixo y). ^[64]

A partir da regressão linear, além dos coeficientes de regressão *a* e *b*, também é possível calcular o coeficiente de determinação r^2 . O seu valor deve ser superior a 0,99, pois quanto mais próximo de 1,0, menor será a dispersão do conjunto de pontos experimental e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. ^[62]

Ao estudar a linearidade assume-se que o desvio-padrão do erro para a variável é constante ao longo da gama de trabalho, isto é, há homogeneidade das variâncias. No entanto, isto nem sempre ocorre podendo-se observar casos de heterocedasticidade, que exibem uma forte dispersão (concentração) dos dados em torno de uma recta. Assim sendo, por vezes, recorre-se a algumas opções na tentativa de os suprimir, tal como transformar os resultados experimentais de modo a alcançar um modelo homocedástico ou aplicar o método dos mínimos quadrados ponderados. ^[65]

A utilização da regressão linear ponderada é a alternativa à regressão linear simples, que tem como objectivo minimizar os erros com a ponderação.

Para a avaliação da linearidade foram extraídas 5 amostras de plasma (PBS) para cada um dos calibradores (8 calibradores distribuídos uniformemente entre 0,1 e 5 µg/mL). As concentrações estudadas foram: 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5 µg/mL).

Neste trabalho, devido à ampla gama de calibração, verificou-se a existência de uma distribuição heterocedástica dos erros, isto é, ocorreram diferenças estatisticamente expressivas entre as variâncias nos extremos da gama de trabalho. Para solucionar este problema optou-se pela utilização de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ponderados.

Foram então seleccionados seis factores de ponderação empíricos, $(1/x)$, $(1/x^2)$, $(1/\sqrt{x})$, $(1/y)$, $(1/y^2)$ e $(1/\sqrt{y})$ e determinou-se qual seria o mais adequado para cada analito, tendo em conta o erro relativo.

Os factores de ponderação seleccionados foram $(1/x)$ para a maprotilina, nortriptilina, trazodona, fluoxetina, clomipramina, $(1/y)$ para a amitriptilina e $(1/\sqrt{x})$ para a sertralina.

Serve como exemplo o caso de um dos antidepressivos estudados (maprotilina), cujos dados relativos ao comportamento da mesma, no 2º dia de validação, são apresentados na tabela 21.

Tabela 21 - Dados para a avaliação da linearidade da maprotilina no 2º dia de validação.

Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Área absoluta maprotilina	Área padrão interno	Razão de áreas (maprotilina/padrão interno)	Concentração calculada ($\mu\text{g/mL}$)	BIAS
0,1	111,562	985,804	0,113169	0,19	-92,97
0,25	200,445	876,071	0,2288	0,29	-16,67
0,5	604,89	1165,74	0,518889	0,54	-7,86
1	1037,85	983,371	1,0554	0,99	0,27
2,5	2255,73	927,803	2,43126	2,17	13,13
5	5674,97	975,883	5,815216	5,06	-1,21

A recta de calibração obtida foi: $y = 1,1499x - 0,0981$ com um $r^2 = 0,99334$.

No entanto, apesar de aparentemente exibir linearidade e um r^2 superior a 0,99 pode-se constatar através da tabela 21 um valor de BIAS, exageradamente elevado, para a concentração teórica de $0,1\mu\text{g/mL}$. Assim sendo, e de forma a tentar corrigir tal situação recorreu-se à ponderação com $(1/x)$. Os resultados obtidos com a mesma estão resumidos na tabela 22.

Tabela 22 - Dados para a avaliação da linearidade da maprotilina no 2º dia de validação com recurso à ponderação de (1/x).

Concentração nominal (µg/mL)	Razão de áreas (maprotilina/padrão interno)	Concentração calculada (µg/mL)	BIAS
0,1	0,113169	0,12	17,12
0,25	0,2288	0,22	-10,99
0,5	0,518889	0,49	-2,62
1	1,0554	0,98	-2,41
2,5	2,43126	2,23	-10,80
5	5,815216	5,31	6,28

O valor de *BIAS* em questão diminuiu consideravelmente e o gráfico construído (concentração em função da razão de áreas) originou a recta de calibração $y = 1,097x - 0,0153$ com um r^2 de 0,9924.

Desta forma as curvas de calibração para cada fármaco foram obtidas por recurso à regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ponderados e, com base nestas, os valores de concentração foram calculados por interpolação da razão entre a área cromatográfica absoluta do composto e a do padrão interno na equação da regressão linear, estando os resultados sumariados na tabela 23.

Tabela 23 - Dados de linearidade para os fármacos estudados (n=5).

Fármaco	Regressão	Gama de trabalho (µg/mL)	Linearidade		R ² (média ± SD)
			Declive (média ± SD)	Ordenada na origem (média ± SD)	
Amitriptilina	1/y	0,1 - 5	1,5174 ± 0,0932	-0,0012 ± 0,03711	0,9974 ± 0,0017
Trazodona	1/x	0,1 - 5	0,8638 ± 0,1024	-0,0109 ± 0,0246	0,9962 ± 0,0036
Fluoxetina	1/x	0,1 - 5	0,2236 ± 0,0849	0,0145 ± 0,0145	0,9979 ± 0,0016
Clomipramina	1/x	0,1 - 5	1,2840 ± 0,0847	-0,0069 ± 0,0623	0,9957 ± 0,0024
Dotiepina	1/x	0,1 - 5	1,3104 ± 0,1080	-0,0361 ± 0,0238	0,9949 ± 0,0055
Nortriptilina	1/x	0,1 - 5	0,8686 ± 0,0319	-0,0114 ± 0,0233	0,9962 ± 0,0034
Maprotilina	1/x	0,1 - 5	1,1655 ± 0,0463	-0,0354 ± 0,0255	0,9953 ± 0,0028
Sertralina	1//x	0,25 - 5	0,9984 ± 0,1076	-0,1012 ± 0,0285	0,9979 ± 0,0012

* SD - *standard deviation*- desvio-padrão

Pode-se concluir, por análise da tabela, que o método descrito é linear na gama de trabalho utilizada para os compostos em estudo, uma vez que a análise de regressão linear ponderada mostrou valores de r^2 superiores a 0,99 para todos os compostos e os valores de *BIAS* entre as concentrações teóricas e as concentrações calculadas são considerados adequados enquadrando-se no intervalo de ± 15% para a concentração nominal, excepto para o LLOQ para o qual 20% é aceitável.

Adicionalmente, para verificar a linearidade do método e a capacidade de quantificação em cada curva de calibração e para cada antidepressivo foram preparados e analisadas diariamente duas amostras controlo às concentrações de 0,7 e 4 µg/mL.

De referir ainda que os resultados para a venlafaxina não foram apresentados, uma vez que, a presença da mesma apenas foi determinada qualitativamente e não quantitativamente, como já foi referido anteriormente.

2.3.3. PRECISÃO

Descreve a proximidade das medições individuais de um analito, quando o procedimento é aplicado mais de uma vez numa mesma amostra homogénea, em idênticas condições de análise. A precisão deve ser determinada usando, o mínimo, de 5 determinações por concentração. É recomendado também que, 3 das concentrações se encontrem no intervalo de concentrações esperadas.^[61]

No fundo, a precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, de uma mesma amostra em determinadas condições. A precisão é avaliada usualmente pela estimativa do desvio padrão absoluto (s) e através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação - *coefficient of variation* (CV).^[64] A precisão expressa a repetitividade do tempo de retenção/área do analito, sendo considerado um excelente resultado quando o CV (%) para o equipamento é menor que 5%.^[62] Quando tal não se consegue alcançar, a precisão determinada a cada nível de concentração não deve exceder 15% do CV, excepto para o LLOQ, que não deverá exceder os 20% do CV.^[40]

O s e o CV podem ser obtidos utilizando as equações 3 e 4, respectivamente.

$$s = \sqrt{\frac{\sum x_i - (\bar{X})}{(n - 1)}} \quad (3)$$

Onde,

\bar{X} é a média aritmética de um pequeno número de medições;

x_i é o valor individual de uma medição;

n é o número de medições.

$$RSD(\%) \text{ ou } CV(\%) = \left(\frac{s}{\bar{X}} \right) \times 100 \quad (4)$$

A precisão é normalmente determinada para condições específicas de medição, sendo geralmente expressa em termos de:

- A- Repetitividade: representa o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efectuadas sobre as mesmas condições de medição, que compreendem um mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento, mesmo local e repetições num curto espaço de tempo. Pensa-se que para o cálculo do CV (%) são necessárias 9 repetições (3 níveis, 3 repetições em cada um). ^[62,64] A repetitividade é também designada como precisão intradia.
- B- Precisão intermediária: refere-se à precisão avaliada utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exactamente quais as condições a variar, tais como: diferentes dias de análise, diferentes analistas, diferentes equipamentos. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa de variabilidade dos resultados num laboratório e, como tal, mais aconselhável para se usar. A precisão intermediária é também designada por precisão interdía. ^[66]
- C- Reprodutibilidade: caracteriza o grau de concordância entre medições de um mesmo método efectuadas sob condições diversas de medição, como mudança de laboratório, de operadores e equipamento. ^[64] Desta forma, a reprodutibilidade expressa a precisão entre laboratórios (por exemplo: estudos a desenvolver em colaboração, geralmente aplicada à *standardization* de metodologias). Esta tem que ser avaliada apenas se o método em questão tiver que ser aplicado em diferentes laboratórios. ^[66]

No trabalho em questão foram analisadas amostras de plasma fortificadas com todos os analitos alvo de estudo a 3 concentrações (0,25, 1 e 5 µg/mL). Para cada uma destas concentrações foram efectuadas 6 réplicas para assim se proceder à avaliação da precisão das medidas efectuadas no mesmo dia - precisão intradia. Para a análise da precisão interdía foram utilizadas amostras de plasma fortificadas com todos os analitos alvo de estudo a 2 concentrações (0,7 e 4 µg/mL) durante todos os dias da validação (5 dias). Os resultados são apresentados nas tabelas 24 e 25.

Tabela 24 - Precisão interdia e exactidão (n=5).

Fármaco	Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração calculada ($\mu\text{g/mL}$) \pm SD	CV (%)	BIAS
Amitriptilina	0,7	0,70 \pm 0,06	8,02%	-0,61
	4	3,99 \pm 0,24	5,92%	-0,23
Trazodona	0,7	0,72 \pm 0,06	7,91%	2,90
	4	3,97 \pm 0,43	10,93%	-0,73
Fluoxetina	0,7	0,77 \pm 0,13	17,24%	9,88
	4	3,66 \pm 0,42	11,37%	-8,45
Clomipramina	0,7	0,68 \pm 0,07	10,70%	-3,56
	4	3,95 \pm 0,27	6,90%	-1,29
Dotiepina	0,7	0,70 \pm 0,06	8,32%	-0,47
	4	4,05 \pm 0,23	5,61%	1,33
Nortriptilina	0,7	0,71 \pm 0,05	7,76%	1,19
	4	3,98 \pm 0,23	5,76%	-0,50
Maprotilina	0,7	0,70 \pm 0,04	5,42%	0,28
	4	4,20 \pm 0,40	9,54%	4,99
Sertralina	0,7	0,67 \pm 0,06	9,14%	-3,89
	4	3,63 \pm 0,34	9,40%	-9,15

* SD - standard deviation- desvio-padrão

Tabela 25 - Precisão intradia e exactidão (n=5).

Fármaco	Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração calculada ($\mu\text{g/mL}$) \pm SD	CV (%)	BIAS
Amitriptilina	0,25	0,27 \pm 0,01	2,88	7,92
	1	0,98 \pm 0,05	5,46	6,59
	5	4,82 \pm 1,19	24,62	-5,35
Trazodona	0,25	0,25 \pm 0,02	7,65	-9,58
	1	1,01 \pm 0,01	1,32	2,94
	5	5,21 \pm 1,35	25,93	5,76
Fluoxetina	0,25	0,25 \pm 0,035	14,30	-11,84
	1	1,06 \pm 0,02	1,95	6,63
	5	5,02 \pm 0,27	5,46	-0,88
Clomipramina	0,25	0,27 \pm 0,03	12,64	-15,15
	1	1,02 \pm 0,07	6,91	12,22
	5	4,66 \pm 1,18	25,37	-11,89
Dotiepina	0,25	0,27 \pm 0,03	12,36	-3,67
	1	0,97 \pm 0,05	4,69	1,59
	5	5,20 \pm 0,97	18,67	-0,21
Nortriptilina	0,25	0,27 \pm 0,02	8,41	-8,54
	1	1,04 \pm 0,06	5,60	9,05
	5	5,30 \pm 0,56	10,52	-0,14
Maprotilina	0,25	0,24 \pm 0,01	5,85	-13,11
	1	0,95 \pm 0,03	2,99	-5,73
	5	5,37 \pm 1,16	21,51	4,48
Sertralina	0,25	0,24 \pm 0,01	2,56	-0,73
	1	0,87 \pm 0,04	4,91	-9,62
	5	4,75 \pm 0,50	10,52	-0,99

* SD - standard deviation- desvio-padrão

Os resultados relativos à precisão inter- e intradia representam CV inferiores a 15 % na maioria dos casos, para todos os analitos e concentrações em estudo. Contudo, nos casos em que esse valor é superior a 15% pode-se constatar que o valor de *BIAS* é adequado. Assim

sendo, de uma forma geral os valores de CV estão em conformidade com os critérios de validação preconizados neste trabalho. Tal condição é explicável pelo uso de padrão interno, que possibilitou a minimização de variações durante o processo extractivo. ^[61]

2.3.4. EXACTIDÃO

Descreve a proximidade da média dos resultados obtidos pelo método do valor real (concentração) do analito. É determinada através da repetição da análise de amostras que contêm quantidades conhecidas de analito. Deve ser determinada usando, o mínimo, de 5 determinações por concentração, sendo recomendado que, um mínimo, de 3 concentrações esteja englobado pelo intervalo de concentrações esperadas. O valor médio deve encontrar-se nos 15% do valor actual, excepto para o LLOQ, que não pode apresentar um desvio maior de 20%. O desvio da média do valor real serve como medida da exactidão. ^[61] A exactidão de um método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro. Também pode ser denominada erro relativo médio (ERM) ou *BIAS*.

Os processos mais utilizados para avaliar a exactidão de um método são:

- A) **Materiais de referência certificados:** são materiais acompanhados de um certificado que possui o valor de concentração de uma dada substância, ou outra grandeza para cada parâmetro e uma incerteza associada. Os valores da média e da estimativa do desvio padrão obtidos pelo laboratório para uma série de réplicas da mesma amostra padrão devem ser comparados com os valores certificados do material de referência, para verificar a exactidão do método. ^[64]
- B) **Ensaio de recuperação:** a recuperação do analito num ensaio é a resposta do detector obtida da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada, comparativamente à resposta do detector obtida com a concentração real do padrão autêntico puro. ^[61] A recuperação diz respeito à eficiência de extracção de um determinado método analítico dentro dos limites de variabilidade, ou seja, ela deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse, pois a dispersão dos resultados tende a aumentar com a diminuição da concentração. ^[61,64] A recuperação do analito não precisa de ser 100%, mas a extensão da recuperação do analito e do padrão interno deve ser consistente, precisa e reprodutível. Ela deve ser avaliada através da comparação dos resultados analíticos das amostras extraídas a 3 níveis de concentração (baixo, médio e alto) com padrões não extraídos que representam 100% de recuperação. ^[61]

- C) **Comparação de métodos:** consiste na comparação entre resultados obtidos utilizando-se o método em desenvolvimento e os resultados conseguidos através de um método de referência, avaliando-se o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos 2 métodos, ou seja, o grau de exactidão do método testado em relação ao de referência.
- D) **Adição padrão:** este método é usado quando for difícil ou impossível obter uma amostra branca, ou seja, a matriz sem a substância de interesse. Neste método, quantidades conhecidas da substância de interesse são adicionadas em diferentes níveis numa amostra que já contenha quantidades desconhecidas da substância, antes do procedimento de preparação da amostra. ^[64]

Nas tabelas 24 e 25, foi também destacado o parâmetro de exactidão (*BIAS*) para cada antidepressivo em estudo e para todas as concentrações. Em todos os casos o valor obtido para este parâmetro foi inferior ou igual a $\pm 15\%$ da concentração nominal. Sendo assim, pode-se inferir que estes valores estão em conformidade com os critérios de validação utilizados. ^[61]

2.3.5. LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção (LOD) representa a menor concentração da substância em análise e que pode ser detectada com certo limite de confiança, utilizando um determinado procedimento experimental, mas não necessariamente quantificada. O limite inferior de quantificação (LLOQ) traduz a mais baixa concentração do analito que pode ser quantificada com certa confiança nas condições experimentais. Pode ser medido com precisão e exactidão adequadas, isto é, com um CV inferior a 20% e *BIAS* num intervalo de $\pm 20\%$ da concentração nominal. ^[62] O padrão mais baixo da curva de calibração deve ser aceite como limite de quantificação se as seguintes condições forem satisfeitas:

- A resposta do analito no LLOQ deve ser, pelo menos, 5 vezes da resposta comparativamente à resposta da amostra branca.
- O pico do analito (resposta) deve ser identificável, discreto e reprodutível com uma precisão de 20% e exactidão compreendida entre 80-120%. ^[61]

O limite de detecção (LOD) pode ser determinado por 3 métodos diferentes:

- A) **Visual:** o LOD é determinado através da adição de concentrações conhecidas do analito à matriz, de tal modo que se possa determinar o menor nível em que o analito realmente pode ser detectado.
- B) **Relação sinal/ruído:** o LOD é determinado através da comparação que é realizada entre a medição dos sinais de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito na matriz e um branco dessas amostras. Assim, é estabelecida uma

concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. [64] Nestes casos é importante conhecer o conceito de ruído, que nos métodos cromatográficos, consiste na flutuação da linha base do cromatograma. É a diferença entre a maior altura e a maior profundidade dos picos, não relacionada com algum composto detectado. [39]

- C) **Baseado em parâmetros da curva analítica:** o LOD é determinado através de parâmetros da curva analítica de acordo com a equação:

$$LOD = 3,3 \times \left(\frac{s}{a}\right) \quad (5)$$

Onde,

s é a estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação da recta da curva analítica;

a é o declive ou coeficiente angular da equação da recta da curva analítica.

Os mesmos critérios usados para a determinação do LOD podem ser adoptados para o LLOQ. No caso dessa determinação se basear em parâmetros da curva analítica, utiliza-se a seguinte equação: [38]

$$LOQ = 10 \times \left(\frac{s}{a}\right) \quad (6)$$

Tabela 26 - Resumo do limite inferior de quantificação para cada fármaco estudado (n = 5).

Fármaco	LLOQ (µg/mL)	Concentração nominal (µg/mL) ± SD	C.V. (%)	BIAS
Amitriptilina	0,1	0,10 ± 0,02	13,46	-7,69
Trazodona	0,1	0,10 ± 0,01	11,29	-1,38
Fluoxetina	0,1	0,10 ± 0,01	13,46	-7,69
Clomipramina	0,1	0,11 ± 0,01	9,59	-9,27
Dotiepina	0,1	0,12 ± 0,02	14,45	7,20
Nortriptilina	0,1	0,11 ± 0,01	10,45	-8,43
Maprotilina	0,1	0,11 ± 0,01	8,16	2,71
Sertralina	0,1	0,15 ± 0,02	14,43	35,84
	0,25	0,23 ± 0,03	10,91	-15,77

* SD - *standard deviation*- desvio-padrão.

Neste estudo, o LOD e o LLOQ foram coincidentes para todos os antidepressivos abordados, cujo valor foi de 0,1 µg/mL, com excepção da sertralina, onde o LOD foi de 0,1 µg/mL e o LLOQ de 0,25 µg/mL.

Estes resultados são satisfatórios, tendo em conta o reduzido volume de amostra, 0,5 mL e o facto de se tratar de cromatografia líquida. Contextualizando os resultados alcançados com outros já realizados e nomeados na revisão bibliográfica do presente trabalho, pode-se considerar que os mesmos foram pertinentes. Dos trabalhos citados apenas 2 apresentaram as mesmas condições de trabalho que o então presente sugeriu (técnica de preparação da amostra - SPE e sistema cromatográfico e de detecção - HPLC/UV-DAD). Palego *et al.* (2001), descreveu para a clomipramina um LOD de 10 µg/mL e um LLOQ de 25 µg/mL para um volume de amostra de 1 mL. Assim sendo é notória a superioridade dos resultados do presente trabalho, que com apenas um volume de 0,5 mL consegui distinguir um LOD e LLOQ de 0,1 µg/mL para o mesmo fármaco. Por outro lado, Mercolini *et al.* (2008), caracterizou para a trazodona um LOD de 4 ng/mL e um LLOQ de 10 ng/mL, com apenas 0,25 mL de amostra, resultados estes visivelmente melhores que os obtidos no presente trabalho.

De uma forma geral, comparando entre si, os estudos já mencionados para a determinação de LOD e LLOQ no caso dos antidepressivos, verifica-se que as metodologias que aplicaram cromatografia gasosa apresentaram LOD e LLOQ na escala dos ng. Por outro lado, sabe-se ainda que esta capacidade para detectar/quantificar níveis muito baixos só foi passível de ser alcançada com metodologias de cromatografia líquida quando estas estiveram acopladas à espectrometria de massa.

2.3.6. RECUPERAÇÃO

A recuperação ou rendimento de extracção de um analito é a relação percentual entre a resposta obtida do detector a partir de uma quantidade de analito adicionado e posteriormente extraído da matriz biológica e a resposta desse detector para a quantidade de analito teoricamente presente (sem extracção). A recuperação indica portanto a eficácia da extracção de um método analítico. A recuperação do analito não precisa de ser 100%, desde que seja reprodutível e o método apresente precisão adequada. ^[61] No entanto, este parâmetro deverá ser otimizado antes da validação do método, mas tal optimização não pertence ao âmbito do presente estudo. A avaliação deste parâmetro foi previamente calculada aquando a optimização da técnica de extracção. ^[45]

$$\text{Recuperação} = (\text{Área A} / \text{Área B}) \times 100 \quad (7)$$

Onde,

Área A é a área do pico do analito sujeito a extracção;

Área B é a área do pico do analito não sujeito a extracção.

Os valores de recuperação obtidos para o método de extracção em questão estão resumidos na tabela 27.

Tabela 27 - Valores para a recuperação obtidos com o método de extracção utilizado neste trabalho.

Fármaco	Recuperação (média ± SD)		
	Concentração (µg/mL)		
	0.25	1	2.5
Maprotilina	95,10 ± 0,32	91,98 ± 1,55	96,39 ± 2,69
Venlafaxina	67,42 ± 0,89	65,24 ± 2,05	83,08 ± 1,55
Nortriptilina	78,25 ± 2,88	87,56 ± 2,57	95,99 ± 1,33
Amtriptilina	90,59 ± 1,92	95,91 ± 1,34	93,72 ± 1,64
Trazodona	89,20 ± 1,45	87,62 ± 2,45	92,38 ± 2,32
Dotiepina	88,79 ± 3,23	96,27 ± 2,13	99,94 ± 2,31
Fluoxetina	98,50 ± 1,32	86,98 ± 0,22	95,30 ± 4,32
Sertralina	74,50 ± 2,36	81,55 ± 1,27	97,36 ± 1,03
Clomipramina	93,85 ± 3,74	91,03 ± 3,00	93,27 ± 2,23

* SD - *standard deviation*- desvio-padrão

Em geral, as recuperações obtidas são comparáveis com as resultantes dos trabalhos de Shinozuka *et al.* (2006) e Patel *et al.* (2009) e superiores às dos trabalhos de Patel *et al.* (2008) no estudo com a trazodona, de Chen *et al.* (2004), de Yazdi *et al.* (2008), de Daniela *et al.* (2009) e De Freitas *et al.* (2010). Contudo as recuperações devem ser consideradas com sentido crítico, uma vez que os métodos descritos visam detectar um número relativamente elevado de analitos. Por outro lado, tendo em conta que nenhuma tecnologia de espectrometria de massa foi utilizada e, portanto, os compostos tiveram que ser separados de acordo com seu tempo de retenção apenas, deve ser destacado o compromisso que teve de ser estabelecido, a fim de maximizar o número de compostos detectados.

3. APLICAÇÃO DO MÉTODO A AMOSTRAS REAIS

Como parte do processo de validação, a metodologia anteriormente descrita foi aplicada a 3 amostras reais procedentes de indivíduos intoxicados por antidepressivos. Estas amostras foram obtidas no Serviço de Urgência do Hospital de São José em Lisboa. As concentrações dos antidepressivos são apresentadas na tabela 28 e o cromatograma de umas das amostras, neste caso a amostra 1, está representado na figura 20.

Tabela 28 - Compostos identificados nas amostras reais e respectiva quantificação.

Amostra	Antidepressivo identificado	Concentração (µg/mL)
1	Sertralina	2,27
	Amitriptilina	0,50
	Nortriptilina	0,46
2	Trazodona	0,38
3	Amitriptilina	n.d.
	Nortriptilina	0,15

* n.d. - não detectado.

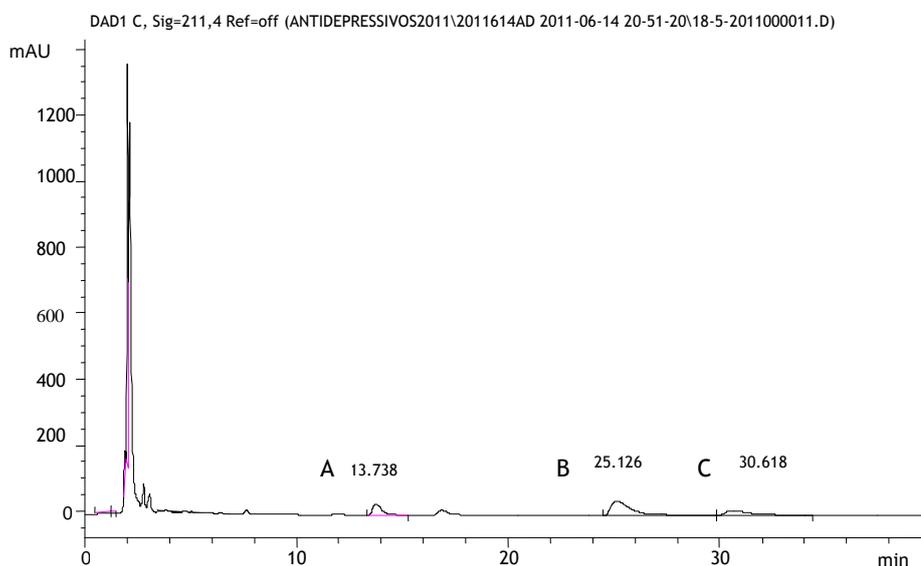


Figura 20 - Cromatograma correspondente à amostra 1 (A-nortriptilina; B-sertralina; C-amitriptilina).



CONCLUSÕES

1. Propõe-se um método analítico baseado na extracção em fase sólida e análise de cromatografia líquida de alta resolução acoplada a um detector de fotodiodos para a determinação quantitativa de 8 antidepressivos (trazodona, maprotilina, nortriptilina, fluoxetina, dotiepina, sertralina, amitriptilina e clomipramina) e determinação qualitativa de 1 antidepressivo (venlafaxina) em amostras de plasma humano.
2. A metodologia apresentada revelou ser selectiva, sensível, linear dentro do intervalo de concentrações estudado, precisa e exacta segundo os critérios internacionalmente aceites para a validação de métodos bionalíticos.
3. A sensibilidade deste método é notória, uma vez que se obteve resposta cromatográfica com um volume de injeção de apenas 2 μL obtendo-se limites de detecção de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ para todos os fármacos analisados. Estes valores são comparáveis aos publicados por outros autores mesmo utilizando um detector de *Diode-array*.
4. Com os resultados apresentados, podemos afirmar que a metodologia aqui proposta pode tornar-se uma ferramenta vantajosa não só na monitorização terapêutica na prática clínica, bem como no estudo de casos de intoxicação mortais, no âmbito da Toxicologia Forense.
5. Por outro lado, futuros estudos que permitam a aplicação sistemática desta metodologia em indivíduos com tratamento com antidepressivos, bem como outros que permitam o doseamento de neurotransmissores, poderão tornar-se uma ferramenta poderosa na optimização da terapêutica, melhorando assim a qualidade de vida destes doentes.



BIBLIOGRAFIA

1. S Hyman, D Chisholm, R Kessler, V Patel, H Whit. *Disease Control Priorities in Developing Countries*. 2ª edição, 2006, Capítulo 31.
2. A Plenis, T Bączek. *Modern chromatographic and electrophoretic measurements of antidepressants and their metabolites in biofluids*. 2011, Biomedical Chromatography, Vol. 25, pp. 164-98.
3. LE Schechter, RH Ring, CE Beyer, ZA Hughes, X Khaw. *Innovative Approaches for the Development of Antidepressant*. 2005, The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics, Vol. 2, pp. 590-611.
4. National Institute of Mental Health. *Depression*. 2008, U.S. Department of Health & Human Services, pp. 2-18.
5. Ministério da Saúde. *Depressão - Portal da Saúde*. [Online] [Citação: 21 de Fevereiro de 2011.] <http://www.min-saude.pt>.
6. SA Hollingworth, PM Burgess, HA Whiteford. *Affective and anxiety disorders: prevalence, treatment and antidepressant medication use*. 2010, Australian and New Zealand Journal of Psychiatry, Vol. 44, pp. 513-19.
7. Wikimedia Foundation, Inc. [wiki/Major_depressive_disorder](http://en.wikipedia.org/wiki/Major_depressive_disorder). [Online] [Citação: 27 de Fevereiro de 2011.] <http://en.wikipedia.org>.
8. M Fornaro, D Prestia, S Colicchio, G Perugi. *A systematic, updated review on the antidepressant agomelatine focusing on its melatonergic modulation*. 2010, Current Neuropharmacology, Vol. 8, pp. 287-304.
9. American Psychiatric Association. *DSM-IV-TR Manual de Diagnóstico e Estatística das Perturbações Mentais*. 4.ª edição, 2002.
10. Observatório do Medicamento e dos Produtos de Saúde. *Evolução do consumo de antidepressivos em Portugal Continental de 1995 a 2001: impacto das medidas reguladoras*. 2002, Infarmed.
11. W Osswald, S Guimarães. *Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas*. 4ª edição. Capítulos 6,7,8 e 12.
12. FL Muñoz, HJ Assion, C Alamo, PG García. *Contribución de la iproniazida y la imipramina al desarrollo de la psiquiatria biológica: primeras hipótesis etiopatogénicas de los trastornos afectivos*. 2007, Psiquiatria Biológica.
13. FL Muñoz, HJ Assion, C Alamo, PG García, P Fangman. *La introducción clínica de la iproniazida y la imipramina: medio siglo de terapéutica antidepressiva*. 2008, Anales de Psiquiatria.

14. RA Moreno, DH Moreno, MBM Soares. *Psicofarmacologia de antidepressivos*. 1999, Vol. 21.
15. WR Malfará, C Bertucci, ME Queiroz, SD Carvalho, MP Bianchi, EJ Cesarino, JÁ Crippa, RC Queiroz. *Reliable HPLC method for therapeutic drug monitoring of frequently prescribed tricyclic and nontricyclic antidepressants*. 2007, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 44, pp. 955-62.
16. JWG Tiller. *The new antidepressants*. 1995, *Australian Prescriber*, pp. 92-6.
17. C Bodinat, BG Lemaitre, E Mocaër, P Renard, C Muñoz, MJ Millan. *Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development*. 2010, pp. 628-42.
18. Infarmed. *Valdoxan - agomelatina - para o tratamento de episódios de depressão major em adultos*. [Online] [Citação: 3 de Abril.] [http:// www.infarmed.pt](http://www.infarmed.pt).
19. DD Berardis, GD Iorio, T Acciavatti, C Conti, N Se. *The Emerging Role of Melatonin Agonists in the Treatment of Major Depression: Focus on Agomelatine*. 2011, *CNS & Neurological Disorders*, Vol. 10, pp. 119-32.
20. SH Preskorn, MJ Burke. *Standard Antidepressant Pharmacotherapy for the Acute Treatment of Mood Disorders*. 2000.
21. CA Silva, CH Collins. *Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes*. 2011, *Quim. Nova*, Vol. 34, pp. 665-76.
22. P Baumann, C Hiemke, S Ulrich, G Eckermann, I Gaertner, M Gerlach, HJ Kuss, G Laux, BM Oerlinghausen, ML Rao, P Riederer, G Zerning, G. *The AGNP-TDM Expert Group Consensus Guidelines: Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry*. 2004, *Pharmacopsychiatry*, Vol. 37, pp. 243-65.
23. LAS Romeiro, CAM Fraga, EJ Barreiro. *Novas estratégias terapêuticas para o tratamento da depressão: uma visão da Química Medicinal*. 2002, *Quim. Nova*, Vol. 26, pp. 347-58.
24. E Ernst. *Métodos Práticos para recuperar a saúde aplicando a medicina complementar*. 2000.
25. J Flórez, JA Armijo, Á Mediavilla. *Farmacología humana*. 3ª edição. 1997, pp. 549-63.
26. Infarmed. *Resumo das Características do Medicamento Ludiomil 10, 25, 50 e 75 mg comprimidos revestidos por película*. Aprovado a 11 de Setembro de 2008.
27. M Lader. *Avery's Drug Treatment*. 4ª edição, 1997, pp. 1416-25.

28. **BJ Sadock, VA Sadock, N Sussman.** *Manual de Farmacologia Psiquiátrica de Kaplan & Sadock.* 4ª edição. 2007, pp. 337-50.
29. **Infarmed.** *Resumo das Características do Medicamento Anafranil 10 e 25 mg comprimidos revestidos e 75 mg comprimidos de libertação prolongada.* Aprovado a 21 de Janeiro de 2011.
30. **Infarmed.** *Resumo das Característica do Medicamento TRYPTIZOL 10, 25 e 50 mg comprimidos revestidos.* Aprovado a 17 de Dezembro de 2010.
31. **ME Burton, LM Shaw, JJ Schentag, WE Evans.** *Applied Pharmacokinetics & Pharmacodynamics.* 4ª edição, 2006, pp. 781-93.
32. **Infarmed.** *Resumo das Características do Medicamento Sertralina Winthrop 50 e 100 mg Comprimidos revestidos por película.* Aprovado a 13 de Novembro de 2008.
33. **Infarmed.** *Prontuário terapêutico - Fluoxetina.* [online] [Citação: 23 de Abril de 2011] <http://www.infarmed.pt>.
34. **N Unceta, S Barrondo, IR Azúa, AG Caballero, MA Goicolea, J Sallés, RJ Barrio.** *Determination of fluoxetine, norfluoxetine and their enantiomers in rat plasma and brain samples by liquid chromatography with fluorescence detection.* 2007, Journal of Chromatography B, Vol. 852, pp. 519-28.
35. **S Montgomery.** *Serotonin/noradrenaline inhibitors: logical evolution of the development of antidepressants.* 2006, International Journal of Psychiatry in Clinical Practice.
36. **Infarmed.** *Prontuário terapêutico - Venlafaxina.* [online] [Citação: 2 de Março] <http://www.infarmed.pt>.
37. **MA Cantarelli, MA Marcolin.** *Trazodona: farmacologia e interações medicamentosas.* 2006, Revista de Psiquiatria Clínica, pp. 329-36.
38. **SM Stahl.** *Mechanism of Action of Trazodone: a Multifunctional Drug.* 2009, MBL Communications Inc, pp. 536-46.
39. **Infarmed.** *Resumo das Características do Medicamento Trazone 50 e 100 mg comprimidos.* Aprovado a 4 de Novembro de 2008.
40. **J Hasselstrom.** *Quantification of antidepressants and antipsychotics in human serum by precipitation and ultra high pressure liquid chromatography - tandem mass spectrometry.* 2011, Journal of Chromatography B, Vol. 879, pp. 123-28.

41. C Frahnert, ML Rao, K Grasmader. *Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring*. 2003, Journal of Chromatography B, Vol. 794, pp. 35-47.
42. E Choong, S Rudaz, A Kottelat, S Haldemann, D Guillarme, JL Veuthey, CB Eap. *Quantification of 4 antidepressants and a metabolite by LC-MS for therapeutic drug monitoring*. 2011, Journal of Chromatography B, Vol. 879, pp. 1544-50.
43. The International Association of Forensic Toxicologist. *Therapeutic and toxic drug concentrations list*. [Online] [Citação: 27 de Abril de 2011] <http://www.tiaft.org>.
44. C Furtado, M Ribeirinho, M Gaspar. *Análise da Evolução da Utilização de Psicofármacos em Portugal Continental entre 2000 e 2009*. 2010, Observatório do Medicamento e Produtos de Saúde, Direcção de Economia do Medicamento e Produtos de Saúde - Infarmed.
45. AS Domingos. *Dissertação de Mestrado: Determinação de antidepressivos em plasma e urina - comparação de duas técnicas de extracção*. 2009, Universidade da Beira Interior.
46. SN Queiroz, CH Collins, IC Jardim. *Métodos de extracção e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica*. 2001, Quim. Nova, Vol. 24, pp. 68-76.
47. Sigma Aldrich. *Guide to Solid Phase Extraction*. 1998.
48. H Juan, Z Zhiling, L Huande. *Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/ESI)*. 2005, Journal of Chromatography B, Vol. 820, pp. 33-39.
49. T Shinozuka, M Terada, E Tanaka. *Solid-phase extraction and analysis of 20 antidepressant drugs in human plasma by LC/MS with SSI method*. 2006, Forensic Science International, Vol. 162, pp. 108-12.
50. R Mandrioli, MA Saracino, S Ferrari, D Berardi, E Kenndler, MA Raggi. *HPLC analysis of the second-generation antidepressant sertraline and its main metabolite N-desmethylsertraline in human plasma*. 2006, Journal of Chromatography B, Vol. 836, pp. 116-19 .
51. AR Chaves, SM Silva, RH Queiroz, FM Lanças, ME Queiroz. *Stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with UV detection for determination of*

- antidepressants in plasma samples*. 2007, Journal of Chromatography B, Vol. 850, pp. 295-302.
52. C Fernandes, AJ Neto, JC Rodrigues, C Alves, FM Lanças. *Solid-phase microextraction-liquid chromatography (SPME-LC) determination of fluoxetine and norfluoxetine in plasma using a heated liquid flow through interface*. 2007, Journal of Chromatography B, Vol. 847, pp. 217-23.
53. C Fernandes, EV Hoeck, P Sandra, FM Lanças. *Determination of fluoxetine in plasma by gas chromatography-mass spectrometry using stir bar sorptive extraction*. 2008, Analytica Chimica Acta, Vol. 614, pp. 201-7.
54. BJ Silva, FM Lanças, ME Queiroz. *In-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography (in-tube SPME/LC) analysis of nontricyclic antidepressants in human plasma*. 2008, Journal of Chromatography B, Vol. 862, pp. 181-88
55. BN Patel, N Sharma, M Sanyal, PS Shrivastav. *Liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for the simultaneous determination of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine in human plasma and its application to a bioequivalence study*. 2008, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol. 47, pp. 603-11.
56. AS Yazdi, N Razavi, SR Yazdinejad. *Separation and determination of amitriptyline and nortriptyline by dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography flame ionization detection*. 2008, Talanta, Vol. 75, pp. 1293-99.
57. BN Patel, N Sharma, M Sanyal, PS Shrivastav. *High throughput and sensitive determination of trazodone and its primary metabolite, m-chlorophenylpiperazine, in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. 2008, Journal of Chromatography B, Vol. 871, pp. 44-54.
58. BN Patel, N Sharma, M Sanyal, PS Shrivastav. *Analysis of second-generation antidepressant drug, sertraline and its active metabolite, N-desmethyl sertraline in human plasma by a sensitive and selective liquid chromatography-tandem mass spectrometry method*. 2009, Journal of Chromatography B, Vol. 877, pp. 221-29.
59. N Unceta, A Ugarte, A Sánchez, AG Caballero, MA Goicolea, RJ Barrio. *Development of a stir bar sorptive extraction based HPLC-FLD method for the quantification of serotonin reuptake inhibitors in plasma, urine and brain tissue samples*. 2010, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol. 51, pp. 178-85.
60. DF Freitas, CE Porto, EP Vieira, ME Siqueira. *Three-phase, liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detection for the simultaneous determination of fluoxetine and*

norfluoxetine in human plasma. 2010, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol. 51, pp. 170-77 .

61. **Food and Drug Administration**. *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*. [Online] [Citação: 10 de Março de 2011.] <http://www.fda.gov>.
62. **CS Vareli**. *Dissertação de Mestrado: Desenvolvimento e Validação de um Método para a Determinação de Etilenotiourea em urina empregando HPLC-UV*. 2008, Centro de Ciências Naturais e Exactas - Universidade Federal de Santa Maria.
63. **International Conference on Harmonization**. *Validation of analytical methods - Methodology ICH Q2*. [online] [Citação: 28 de Abril de 2011] <http://www.ich.org>.
64. **MC Chiaradia**. *Tese de doutoramento: Desenvolvimento, Validação e Aplicação de Métodos para Análise Multiresidual de Agrotóxicos em suco de laranja e tangerina utilizando CLAE-DAD, CL-EM-EM e CLUE-DAD*. 2009, Departamento de Química Analítica, Instituto de Química.
65. **MSC Escada**. *Tese de mestrado: Métodos de análise de piperazinas em fluidos biológicos*. 2007, Departamento de Química.
66. **FT Peters, HH Maurer**. *Bioanalytical method validation - How, how much and why?* Department of Experimental and Clinical Toxicology - Institute of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, University of Saarland.



ANEXOS

- Este trabalho irá ser apresentado no 19th Triennial Meeting of the International Association of Forensic Sciences (IAFS), 9th Triennial Meeting of the World Police Medical Officers (WPMO) e no 5th Meeting of the Mediterranean Academy of Forensic Sciences (MAFS) que se irá realizar em Setembro de 2011, no Funchal, Madeira.

DETERMINATION OF ANTIDEPRESSANT DRUGS IN PLASMA BY RAPID RESOLUTION LIQUID CHROMATOGRAPHY

A. Neto¹, J.A. Queiroz¹, E. Gallardo¹

¹CICS-UBI - Centro de Investigação em Ciências da Saúde Universidade da Beira Interior, Av. Infante D. Henrique 6201-556, Covilhã, Portugal.

The present work describes the quantification of venlafaxine, trazodone, amitriptyline, nortriptyline, clomipramine, fluoxetine, maprotiline, dothiepin, and sertraline in human plasma for application both clinical and forensic toxicology.

Quantitative analysis was performed by rapid resolution liquid chromatography combined with diode array detector (RRLC-DAD) using a Zorbax -C18 column (15 × 4.6 mm; 45 µm) with a mobile phase consisting of 25mM phosphate buffer and acetonitrile (60:40).

Cation-exchange solid-phase extraction (OASIS® MCX) was used to extract these compounds, and protriptyline was used as internal standard.

The validation was performed according to the guiding principles of the FDA and ICH, and the studied parameters included selectivity, linearity and limits, intra- and interday precision and accuracy, and recovery. Calibration curves were linear from 0.1 (LLOQ) to 5 µg/mL for all compounds, with coefficients of determination (R^2) greater than 0.99. Precision and trueness varied from 1.6% to 14.9% and 8.6% to 10.5%, respectively. Absolute recoveries ranged from 71 to 95%.

In general, this SPE-based procedure has demonstrated to be adequate for the sensitive determination of these antidepressants in plasma due to the presence of lower amounts of interfering endogenous substances and to the simplicity and ease of automation presented.

