

**FRANCISCO PEDRO PINTO COELHO PINTO DE ALMEIDA**

**DETERMINAÇÃO DE TRAMADOL E AMITRIPTILINA EM  
SALIVA POR LC-MS. SUA APLICAÇÃO EM AMOSTRAS  
DE CONDUTORES NO ÂMBITO DE UM PROJECTO DE  
INVESTIGAÇÃO EUROPEU**

**UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**2009**



*Dissertação de Candidatura ao*  
*Grau de Mestre em Medicina Legal e Ciências Forenses*  
apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra



Trabalho experimental realizado no  
**Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Centro  
do Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P.**



## PREFÁCIO

*“Para ser grande, sê inteiro: nada  
Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a lua toda  
Brilha, porque alta vive.”  
(Ricardo Reis, Odes)*

*A nossa vida é construída pelos passos que damos. Por vezes damos passos curtos e seguros, já outras arriscamos e damos passos maiores e incertos. Ao pousar os pés em terra firme, após um passo mais longo, sentimos que escolhemos o caminho certo o que nos dá mais confiança para continuar.*

*Ao Senhor Professor Doutor Duarte Nuno Vieira, o meu reconhecimento pela confiança que em mim depositou, o rigor científico que sempre difundiu e a capacidade de, através do seu exemplo, transmitir a exigência de um elevado padrão científico e de conduta moral. Desejo igualmente salientar e agradecer a disponibilização de todos os meios necessários à persecução deste trabalho no Instituto que superiormente dirige, bem como os valiosos ensinamentos sempre transmitidos, sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho. Espero sinceramente que se possa sentir orgulhoso pelo trabalho agora apresentado.*

*A minha sentida e profunda gratidão à minha orientadora, Professora Doutora Helena Maria de Sousa Ferreira e Teixeira, por ter aceite orientar esta tese e a quem agradeço pelos valiosos conhecimentos transmitidos e as críticas pertinentes com as quais pude ultrapassar os obstáculos encontrados. O meu reconhecimento pelo seu elevado rigor científico, sentido crítico, empenho e determinação. Por toda a sua amizade, dedicação, sacrifícios, exigência e confiança em mim depositada, o meu muito obrigado.*

*Ao Senhor Professor Doutor Francisco Corte Real, pelo seu exemplo científico e ensinamentos, bem como pela oportunidade que me deu de poder participar activamente no projecto europeu DRUID, esperando ter correspondido a todas as suas expectativas.*

*À Dr.<sup>a</sup> Maria Alice David Abreu Figueiredo Medeiros o meu profundo agradecimento por ter permitido que eu pudesse concretizar este sonho, com todos os transtornos e alterações ao normal funcionamento da farmácia por si dirigida.*

*A toda a equipa do Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal, agradeço o apoio e incentivos prestados. Pela sua compreensão, amizade e boa disposição, o meu muito obrigado.*

*Um agradecimento muito particular à Dr.ª Paula Proença por ter posto desde o início à minha disposição todo o seu saber e experiência imprescindíveis à realização deste trabalho e que definitivamente contribuíram para que fosse possível atingir esta meta.*

*À Joana Vidinha, pela amizade, carinho, sacrifícios e pelo incondicional apoio prestado nas mais diversas situações.*

*A todos elementos do Instituto Nacional de Medicina Legal envolvidos no projecto DRUID, às equipas da PSP e da GNR – Divisão de Trânsito, por toda a colaboração dispensada, no âmbito da investigação realizada aos voluntários, tornando possível a recolha das amostras de saliva e pelo seu total empenho nesta missão, o meu sincero agradecimento.*

*A todos os meus amigos que sempre me apoiaram e me incentivaram a continuar e a lutar para atingir os meus objectivos, os meus sinceros agradecimentos.*

*Aos meus sogros, à Joana e ao Ricardo, o meu muito obrigado por todo o apoio, compreensão, interesse e opinião.*

*Um agradecimento especial a toda a minha família que desde sempre mostrou o maior interesse pelo trabalho por mim desenvolvido, o que demonstra carinho e amizade*

*À memória dos meus avôs, entre outras coisas pelos genes dominantes de Farmacêutico que um me transmitiu através do meu pai e ao meu avô materno pelo exemplo académico que sempre foi para mim e cujo brilhantismo nunca conseguirei atingir.*

*Ao meu irmão um agradecimento particular não só pelo apoio e companheirismo demonstrado ao longo de todo este trabalho, mas também pela convivência ao longo da vida que me permitiu conhecer muitas das responsabilidades que tenho hoje, em especial de protecção e dedicação aos outros.*

*Aos meus pais por me terem possibilitado ser quem sou e como sou. Por todo o apoio, carinho e dedicação que sempre me demonstraram o meu muito obrigado.*

*À Carolina com quem estabeleci um contrato eterno de dedicação durante este percurso, agradeço o seu companheirismo, motivação e força diariamente transmitidos ao longo destes anos. Pelas minhas ausências, compreensão, paciência, esforços e sacrifícios, o meu reconhecido e carinhoso obrigado.*

*A todos vós que espero não desiludir...*

## ÍNDICE

<b>PREFÁCIO</b>	I
<b>ÍNDICE</b>	1
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b>	5
<b>RESUMO – ABSTRACT</b>	9
<b>Parte I – REVISÃO DA LITERATURA</b>	15
<b>Capítulo I – Tramadol</b>	17
<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2 – ESTRUTURA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS</b> .....	21
<b>3 – PROPRIEDADES FARMACODINÂMICAS</b> .....	22
3.1 – Mecanismo de Acção .....	22
3.2 – Efeitos Farmacodinâmicos .....	24
<b>4 – TOXICOCINÉTICA</b> .....	29
4.1 – Absorção.....	29
4.2 – Distribuição.....	30
4.3 – Metabolismo .....	31
4.4 – Eliminação .....	34
<b>Capítulo II – Amitriptilina</b>	37
<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	39
<b>2 – ESTRUTURA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS</b> .....	41
<b>3 – PROPRIEDADES FARMACODINÂMICAS</b> .....	42
3.1 – Mecanismo de acção .....	42
3.2 – Efeitos Farmacodinâmicos.....	45
<b>4 – TOXICOCINÉTICA</b> .....	50
4.1 – Absorção.....	50
4.2 – Distribuição.....	50
4.3 – Metabolismo .....	51
4.4 – Eliminação .....	53

**Capítulo III – Medicamentos e Condução Rodoviária** 55

1 – INTRODUÇÃO.....	57
2 – A INFLUÊNCIA DO TRAMADOL NA CONDUÇÃO .....	61
3 – A INFLUÊNCIA DA AMITRIPTILINA NA CONDUÇÃO .....	63

**Capítulo IV – Determinação de Tramadol e Amitriptilina em Amostras Biológicas** 65

1 – INTRODUÇÃO.....	67
2 – SALIVA.....	69
2.1 – Influência da Amitriptilina e do Tramadol na produção de saliva.....	74
3 – DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE TRAMADOL E AMITRIPTILINA .....	79
3.1 – Análise em Saliva.....	79
3.2 – Métodos de Confirmação .....	80
3.3 – Métodos de preparação e/ou extracção das amostras .....	86

**Capítulo V – Projecto DRUID – Driving Under the Influence of Alcohol, Drugs and Medicines** 91

1 – RESUMO DO PROJECTO E SEUS OBJECTIVOS .....	93
1.1 – Coordenação do projecto DRUID.....	94
1.2 – Países que integram o projecto DRUID.....	95
2 – PARTICIPAÇÃO PORTUGUESA .....	96

**Parte II – DEFINIÇÃO E JUSTIFICAÇÃO DOS OBJECTIVOS** 99

1 – FUNDAMENTOS GERAIS PARA A DEFINIÇÃO DOS OBJECTIVOS .....	101
2 – OBJECTIVOS GERAIS E OBJECTIVOS ESPECÍFICOS.....	102

**Parte III – CONTRIBUIÇÃO PESSOAL – TRABALHO EXPERIMENTAL** 105**Capítulo I – Caracterização do Método Analítico para Determinação  
Tramadol e Amitriptilina em Saliva** 107

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	109
<b>2 – DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO E CORRESPONDENTE</b>	
<b>METODOLOGIA DE VALIDAÇÃO APLICADA NO ESTUDO</b> .....	110

**Capítulo II – Desenvolvimento de um Método Analítico para a  
Detecção e Quantificação de Tramadol e Amitriptilina em Saliva** 115

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	117
<b>2 – MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	118
2.1 – Substâncias estudadas .....	118
2.2 – Reagentes/Gases .....	119
2.3 – Material utilizado.....	119
2.4 – Sistema de LC-MS.....	120
<b>3 – ENSAIOS EFECTUADOS</b> .....	121
3.1 – Caracterização da metodologia analítica usada para a detecção, identificação e quantificação das substâncias em estudo .....	121
3.2 – Aplicação das condições analíticas finais aos padrões em fase móvel .....	126
3.3 – Estudo em saliva.....	128
3.3.1 – Selecção e preparação da amostra biológica .....	128
3.3.2 – Extracção dos compostos a partir da saliva por fase sólida .....	129
3.3.3 – Validação do Método Analítico – Resultados Obtidos .....	131
<b>I – ESPECIFICIDADE/SELECTIVIDADE</b> .....	131
<b>II – LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO</b> .....	135
<b>III – LINEARIDADE/RECTA DE CALIBRAÇÃO</b> .....	136
<b>IV – PRECISÃO E EXACTIDÃO</b> .....	138
<b>V – RECUPERAÇÃO</b> .....	142

**Capítulo III – Aplicação do Método Analítico Validado em Saliva a Amostras de Casos Reais** 143

**1 – INTRODUÇÃO**..... 145

**2 – MATERIAL E MÉTODOS** ..... 146

    2.1 – Caracterização dos indivíduos voluntários envolvidos no estudo..... 146

    2.2 – Colheita das amostras ..... 148

**3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO** ..... 150

**Capítulo IV – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES** 151

**Parte IV – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 159

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- a.C.** – Antes de Cristo
- AINE's** – Anti-inflamatórios não esteróides
- AMPC** – 3',5'-Monofosfato de adenosina cíclico (“*cyclic 3',5'-adenosine monophosphate*”)
- ANSR** – Autoridade nacional de segurança rodoviária
- AO** – Administração oral
- API** – Ionização à Pressão Atmosférica (“*Atmospheric Pressure Ionization*”)
- APCI** – Ionização Química à Pressão Atmosférica (“*Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*”)
- ATC** – Antidepressivo Tricíclico
- AUC** – Área sob a curva (“*Area under curve*”)
- CL** – Clearance
- COMT** – Catecolamina *o*-metil transferase
- C<sub>max</sub>** – Concentração máxima
- CPT** – Continuous Performance Test
- CV** – Coeficiente de variação
- DM** – Dose múltipla
- DRUID** – Driving Under the Influence of Alcohol, Drugs and Medicines
- DSM IV** – Quarto manual estatístico de diagnóstico de doenças mentais
- DU** – Dose única
- EIA** – Imunoensaios Enzimáticos (“*Enzyme Immunoassay*”)
- ESI** – Ionização por Electrospray (“*Electrospray Ionisation*”)
- FDA** – Food and Drug Administration
- GC** – Cromatografia Gasosa (“*Gas Chromatography*”)
- GC/MS** – Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa (“*Gas Chromatography/Mass Spectrometry*”)
- GC/MS/MS** – Cromatografia Gasosa acoplada a dois detectores de Espectrometria de Massa (“*Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry*”)
- GNR** – Guarda Nacional Republicana
- HPLC ou LC** – Cromatografia Líquida de Alta Resolução (“*High Performance Liquid Chromatography*”)
- ICADTS** – International Council on Alcohol Drugs & Traffic Safety
- IMC** – Índice de Massa Corporal
- INFARMED** – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.
- INML, I.P.** – Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P.
- I.N.T.** – Índice Nacional Terapêutico

- ISRS** – Inibidores Selectivos da Recaptação de Serotonina
- IV** – Intravenosa
- LC/MS** – Cromatografia Líquida acoplada a um Detector de Espectrometria de Massa  
(“*Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*”)
- LC/MS/MS** – Cromatografia Líquida acoplada a dois Detectores de Espectrometria de Massa  
(“*Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*”)
- LLE** – Extracção Líquido-Líquido (“*Liquid Liquid Extraction*”)
- LOD** – Limite de detecção (“*Limit of Detection*”)
- LOQ** – Limite de quantificação (“*Limit of Quantitation*”)
- MAO** – Monoaminoxidase
- MCX** – Meio hidrofílico de troca catiónica
- MNSR** – Medicamentos não sujeitos a receita médica
- PSP** – Polícia de Segurança Pública
- QID** – Quatro vezes por dia
- RCM** – Resumo das características do medicamento
- RIA** – Radioimunoensaio (“*Radioimmunoassays*”)
- RSD** – “*Relative Standard Deviation*”
- SIR** – “*Selected Ion Recording*”
- SNC** – Sistema Nervoso Central
- SPE** – Extracção em Fase Sólida (“*Solid Phase Extraction*”)
- STF** – Serviço de Toxicologia Forense
- TAS** – Teor de álcool no sangue
- TLC** – Cromatografia em Camada Fina (“*Thin Layer Chromatography*”)
- $t_{1/2}$**  – Tempo de semi-vida
- UE** – União Europeia
- UV** – Ultra-Violeta
- $V_d$**  – Volume de distribuição
- WCST** – Wisconsin Card Sorting Test
- WP2** – Work Package 2

# Resumo

*Abstract*



## RESUMO

A amitriptilina é um antidepressivo tricíclico que actua a nível da recaptação de diferentes neurotransmissores ao nível das sinapses, incluindo a serotonina e noradrenalina, potenciando ou prolongando, assim, os seus efeitos.

O tramadol é um analgésico opióide sintético de acção central, análogo à codeína, admitindo-se que actue por uma ligação frágil ao receptor opiáceo  $\mu$ , modulando a percepção da dor, e/ou através da inibição da recaptação sináptica de noradrenalina e de serotonina, actuando sobre o mecanismo de transmissão da dor.

Estes dois medicamentos são actualmente muito utilizados, podendo dar origem a alterações cognitivas e psicomotoras significativas quando associados com a condução rodoviária.

Na lei portuguesa está prevista, através do Código da Estrada aprovado pelo Decreto de Lei nº 44/2005, de 23 de Fevereiro, a proibição da condução sob a influência de álcool ou de substâncias psicotrópicas. Já a fiscalização de condutores suspeitos de se encontrarem sob a influência de álcool e/ou de substâncias psicotrópicas, encontra-se descrita na Lei nº18/2007 de 17 de Maio.

A detecção de substâncias ilícitas pode ser efectuada, não só após o consumo, mas também durante longos períodos que podem ultrapassar as 24 horas, ainda que a concentração máxima destas substâncias seja atingida, tal como no caso do álcool, no intervalo de meia hora a 2 horas (quando administradas por via oral; quando por via nasal, injectável ou fumada o pico de  $C_{máx}$  é imediato).

Actualmente, são várias as amostras biológicas utilizadas, quer em toxicologia clínica quer em toxicologia forense, com o objectivo de detectar e quantificar medicamentos.

As matrizes mais utilizadas para a detecção deste tipo de substâncias são a saliva, o sangue, a urina, o suor e o cabelo.

A saliva é, sem dúvida, a matriz que tem demonstrado maior interesse nos últimos anos graças, particularmente, às vantagens que demonstra em relação às outras matrizes, nomeadamente a nível da facilidade e rapidez de recolha e pelo facto de reflectir melhor a concentração dos medicamentos na sua forma livre e conseqüentemente, traduzir melhor a quantidade de fármaco biologicamente activo em determinado momento.

A detecção, identificação e quantificação destes compostos em amostras de saliva pode ser desenvolvida por diferentes técnicas, tendo especial relevância as técnicas de cromatografia gasosa (GC) e, mais recentemente, as de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS).

Na Parte I da presente dissertação, faz-se uma introdução geral do assunto, pretendendo-se que a mesma seja uma revisão da literatura relativamente à origem do tramadol e da amitriptilina, o seu mecanismo de acção, suas propriedades farmacodinâmicas e toxicocinética, sua prevalência e influência a nível da condução rodoviária e métodos analíticos para a sua determinação.

Na Parte II, define-se como objectivo geral deste trabalho o desenvolvimento de um método analítico devidamente validado que permita proceder à determinação simultânea de tramadol e amitriptilina em amostras de saliva recolhidas a voluntários condutores no âmbito de um projecto europeu (DRUID), utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta resolução (LC), acoplado a um detector de espectrometria de massa (MS), com ionização por *electrospray*.

A Parte III divide-se em três capítulos e descreve, na sequência do atrás mencionado, os trabalhos experimentais realizados, a validação do método desenvolvido e sua aplicação a casos reais, constituindo, desta forma, a nossa contribuição pessoal para o esclarecimento do assunto em estudo.

O método desenvolvido e validado, por LC-MS, para a detecção, identificação, confirmação e quantificação de tramadol e amitriptilina em saliva provou ser específico e sensível, com elevados valores de precisão e exactidão e muito bons limites de detecção e de quantificação tanto para o tramadol (de 0,84 e 2,54 ng/ml, respectivamente), como para a amitriptilina (1,37 e 4,16 ng/ml respectivamente). Este método poderá assim, ser uma excelente opção em alternativa à utilização da cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS) já que permite quantificar, com exactidão e precisão, concentrações muito reduzidas de tramadol e de amitriptilina.

Esta metodologia demonstrou ser pouco morosa, ultrapassando algumas desvantagens das metodologias por GC-MS. Acresce ainda que o método provou ser

selectivo e sensível para um reduzido volume de amostra (500 µl), o que constitui uma vantagem inequívoca para a realização de análises toxicológicas em saliva.

Em conclusão, a metodologia aqui desenvolvida e validada permitirá a determinação, em simultâneo e com uma única metodologia cromatográfica, de tramadol e de amitriptilina em saliva. Como técnica de elevado potencial em toxicologia forense, poderá vir a ser aplicada no Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P.

## *ABSTRACT*

Amitriptyline, a tricyclic antidepressive that has shown capacity to block the reuptake of various neurotransmitters, including serotonin and norepinephrine at the synaptic nerve ends, by this way potentiates and extends the duration of the effects of these neurotransmitters. Tramadol is a synthetic, centrally acting opioid analgesic, similar to codeine, exerting its function by a weak binding to  $\mu$ -opioid receptor and weak inhibition of reuptake of norepinephrine and serotonin, acting on the pain transmission mechanism.

These two drugs belong to the group of the most consumed drugs and both of them have the ability to produce cognitive and psychomotor effects, which could be dangerous to a safe driving performance.

Driving under the influence of alcohol and/or psychotropic substances is punished by the Portuguese jurisdiction, by the document “Código da Estrada” approved on the Law nº 44/2005, from February 23<sup>rd</sup>. Regarding to the control of the impaired drivers there is a specific part of the legislation that describes how it should develop (Law nº 18/2007, from May 17<sup>th</sup>).

The detection of illicit drugs and medicines can be done, not only just after the use, but also after long periods of time that can reach 24 hours, even if the maximum concentration of these substances is reached in the interval of half-hour to 2 hours.

At present time, several biologic samples are being used to perform the detection and quantification of several drugs in clinic and forensic toxicology. The most used matrixes to perform these procedures are oral fluid (saliva), urine, sweat and hair.

Recently, saliva has demonstrated several advantages over the other matrixes, especially in what refers to the collection method (easier and faster) and because it reflects more truthfully the free fraction of the drug that is biologically active at a certain time.

The detection, identification and quantification of these compounds in saliva samples can be done by several different techniques, particularly by gas chromatography (GC) and, more recently, by liquid chromatography associated to mass spectrometry (LC-MS).

In the Part I of this dissertation, is done a general introduction to the subject developed, revising the literature referent to the origin of tramadol and amitriptyline, as well as, to their pharmacology and their pharmacodynamic and pharmacokinetic properties. It has also been taken in consideration their prevalence and influence on driving performance.

The Part II describes the global aim of this paper, which is the development of an analytical method, properly validated, for the simultaneous detection of tramadol and amitriptyline, in saliva samples collected from drivers, voluntarily, as part of the European project DRUID, using a high performance liquid chromatography system associated to a mass spectrometer, with electrospray ionization.

The Part III is divided in three different chapters and describes the experimental trials developed, the method validation steps and its application to real samples.

The developed and validated method by LC-MS, for detection, identification, confirmation and quantification of tramadol and amitriptyline in saliva, proved to be specific and sensitive, with high levels of precision and accuracy and good LOD and LOQ values for tramadol (0,84 and 2,54 ng/ml, respectively) and for amitriptyline (1,37 and 4,16 ng/ml respectively). This method proved to be an excellent option to the existent GC-MS methods, once it is able to quantify, with precision and accuracy, very small amounts of tramadol and amitriptyline, in a short period of time, overcoming some of the disadvantages of the GC-MS techniques. In addition to these facts, the use of such a small amount of saliva (500 µl) is of extreme relevance, once we are talking about toxicological analysis in saliva.

With the developed and validated methodology, excellent results can be obtained to determine, simultaneously, these drugs using a single chromatographic methodology, and in saliva.

This technique has great potential in forensic toxicology, and is already being applied in the Forensic Toxicology Laboratory of the Centre Delegation of the National Institute of Legal Medicine.



# Parte I

*Revisão da Literatura*



# Parte I

## *Capítulo I*

### *Tramadol*



## 1 – INTRODUÇÃO

O tramadol é um analgésico de origem sintética, com estrutura e actividade semelhante aos opióides.

Durante escavações de vestígios da era do neolítico, realizadas na Suíça, foram recolhidos dados que demonstram que desde essa altura a planta *Papaver somniferum* já era utilizada, provavelmente devido à elevada concentração de gorduras nas suas sementes (45%), conhecidas como as sementes da papoila, sendo evidente o seu efeito narcótico (Merlin, 1984). O extracto leitoso recolhido do ovário da planta, extremamente narcótico quando seco, foi denominado de ópio.

Efectivamente, os escritos de Theophrastus (Séc.III a.C.) são os primeiros a fazer referência ao ópio (palavra de origem Grega para sumo da planta). Os médicos árabes conheciam bem as qualidades terapêuticas desta planta e ajudaram a dinamizá-la para o extremo oriente. Na Europa voltou a ser introduzida por Paracelso e em 1680, o médico inglês Sydenham, considerou o ópio como sendo a substância mais eficaz e universal para aliviar todos os sofrimentos do Homem (Berridge, 1994).

No séc. XVII no extremo oriente era, bastante popular o consumo de ópio através do fumo, sendo uma das principais fontes de rendimento das colónias Inglesas, Holandesas e também Espanholas a partir das Filipinas. Apesar de estar disponível na Europa nessa altura, o seu consumo ainda não era problemático ([www.Drugtext.org](http://www.Drugtext.org)).

O ópio contém uma grande variedade de substâncias, isoladas pela primeira vez no séc. XIX. Em 1806 foi isolado um alcalóide específico e foi-lhe atribuído o nome de morfina, em memória de Morpheu, o Deus grego dos sonhos. Desde esta data foram isolados e sintetizados diversos compostos semelhantes à morfina (Williams, 1997). Estes compostos purificados suplantaram rapidamente a utilização do ópio, passando a ser utilizados individualmente com fins terapêuticos específicos (alívio das dores e antidiarreicos) ([www.Drugtext.org](http://www.Drugtext.org)).

A empresa farmacêutica Grunenthal GmbH, fundada em 1946 na Alemanha, que teve como principal objectivo a produção de medicamentos de baixo custo para a população germânica, após a 2ª Guerra Mundial, em 1948 introduziu no mercado a primeira penicilina e foi em 1962 que sintetizou a molécula de tramadol, na

esperança de desenvolver uma molécula similar ao opióides mas com menos efeitos secundários, nomeadamente a depressão respiratória (Tramadol Information, 2008).

Em 1977, foi introduzido no mercado o tramadol sob o nome comercial de Tramal®. Nesta altura, a descoberta desta molécula veio revolucionar o mercado de medicamentos para a dor, já que apresentava características diferentes dos opióides disponíveis no mercado, nomeadamente o duplo mecanismo de acção, que lhe permite manter grande parte da eficácia deste grupo.

Após o lançamento do tramadol no mercado, outras indústrias farmacêuticas introduziram esta molécula com outros nomes comerciais e também sob diferentes formas farmacêuticas. As diferentes formas farmacêuticas desenvolvidas ao longo dos tempos têm permitido que o tramadol continue a ser uma molécula muito utilizada na terapêutica da dor e a sua acção nesta patologia tem permitido manter um elevado padrão de qualidade de vida a milhões de pessoas em todo o mundo (Tramadol Information, 2008).

Em Portugal, o tramadol encontra-se comercializado sob a forma de cloridrato, como componente único, ou em associação. Estão disponíveis comprimidos revestidos de 100 mg, de libertação prolongada de 100, 150 e 200 mg e orodispersíveis de 50 mg, cápsulas duras de 50 mg e de libertação prolongada de 50, 100, 150, 200, 300, 400 mg, supositórios de 100 mg, gotas orais de 100 mg/ml e solução injectável de 100 mg/2ml. A única associação do tramadol disponível é com o paracetamol, apresentando-se em comprimidos revestidos com 37,5 mg e 325 mg, respectivamente.

O tramadol é um medicamento de uso hospitalar e de ambulatório sendo necessária a apresentação de uma prescrição médica válida para que possa ser adquirido. Ao contrário de alguns fármacos do grupo dos opióides, não é um medicamento sujeito a receita médica especial (I.N.T., 2009).

Em Portugal, durante o ano de 2007, foram vendidas 400.974 embalagens de tramadol, ocupando, assim, esta molécula, o 89º lugar na tabela dos cem medicamentos mais prescritos em Portugal, elaborada anualmente pelo Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. (INFARMED). Não apresenta, no entanto, uma grande variação no consumo desde 2006 (403.526 embalagens, 85º lugar), mas já apresenta algum decréscimo em relação a 2005 (457.547 embalagens, 72º) (INFARMED - Estatística do Medicamento, 2005 a 2007).

## 2 – ESTRUTURA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Os opióides são dos fármacos mais eficientes no tratamento da dor. No entanto, receios sobre a possível tolerância, dependência e abuso por eles criados podem ser problemáticos nos esquemas terapêuticos desenvolvidos para controlar a dor crónica (Willweber-Strumpf e Zenz, 1993).

Um analgésico ideal deveria possuir as capacidades analgésicas dos opióides, sem os seus efeitos secundários e sem a toxicidade gastrointestinal dos anti-inflamatórios não esteróides (AINE's). Com este objectivo, foi desenvolvida a molécula de tramadol.

A denominação química do tramadol é  $(\pm)$ -cis-2- [(dimethylamino)methyl]-1-(*m*-methoxyphenyl)cyclohexanol, apresentando a fórmula molecular  $C_{16}H_{25}NO_2$  e um peso molecular de 263,4.

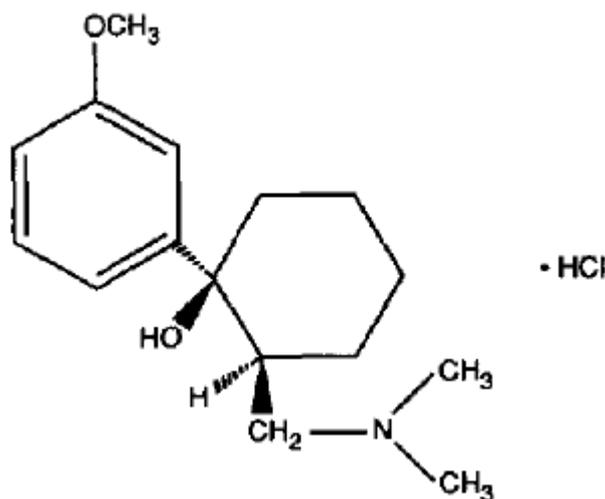


Figura 1 – Estrutura Química do Cloridrato de Tramadol.

O tramadol apresenta dois estereoisómeros e quatro enanteómeros, que são o  $(+/-)$ -cis-2-dimethylaminomethyl-1-(3-methoxyphenyl)-cyclohexanol e o  $(+/-)$ -trans-2-dimethylaminomethyl-1-(3-methoxyphenyl)-cyclohexanol. No entanto, o tramadol é comercializado sob a forma de uma mistura racémica da sua estrutura *cis* (ECDD, 2006), apresentando-se sob a forma de um sal, o cloridrato de tramadol ( $M=299.84$ ), que é um pó branco, amargo, inodoro e cristalino, sendo facilmente solúvel em água e em etanol (Fig.1). Apresenta um  $pK_a$  básico de 9,41 (Daily Med, 2004).

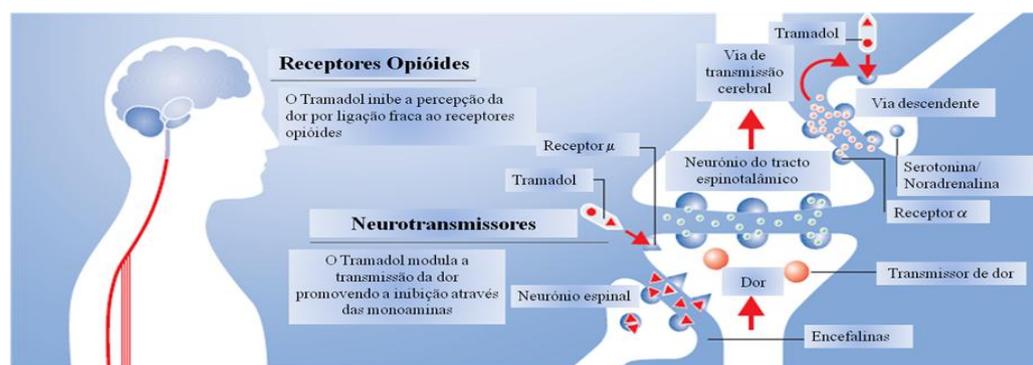
### 3 – PROPRIEDADES FARMACODINÂMICAS

#### 3.1 – Mecanismo de Acção

O tramadol, ao contrário dos opióides convencionais, exerce a sua actividade analgésica através de um duplo mecanismo de acção que resulta na inibição da percepção e da transmissão da dor (Klotz, 2003).

A inibição da percepção deve-se à sua acção a nível dos receptores  $\mu$ -opióides, enquanto a inibição da transmissão se deve ao marcado efeito que exerce sobre o sistema serotoninérgico e noradrenérgico, uma vez que apresenta a capacidade de interferir com a recaptação de serotonina e noradrenalina (actua nos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos), inibindo-a, aumentando assim as suas concentrações ao nível das fendas sinápticas (Raffa e col, 1992; Desmeules, 2000) (Figura 2). Deste modo, estes neurotransmissores vão inibir a transmissão ascendente do estímulo da dor. Outros fármacos (ex. amitriptilina, imipramina) que inibem ou bloqueiam a recaptação dos neurotransmissores monoaminados, quando utilizados em conjunto com os opióides, podem ser considerados adjuvantes importantes na terapêutica da dor, uma vez que potenciam o seu efeito, através de um mecanismo complementar e sinérgico (Malseed e Goldstein, 1979; Raffa e col., 1993).

O início do efeito analgésico do tramadol é similar a outros analgésicos, sendo, no entanto, a sua acção mais prolongada (Lintz, 1986; Liao e col., 1992).

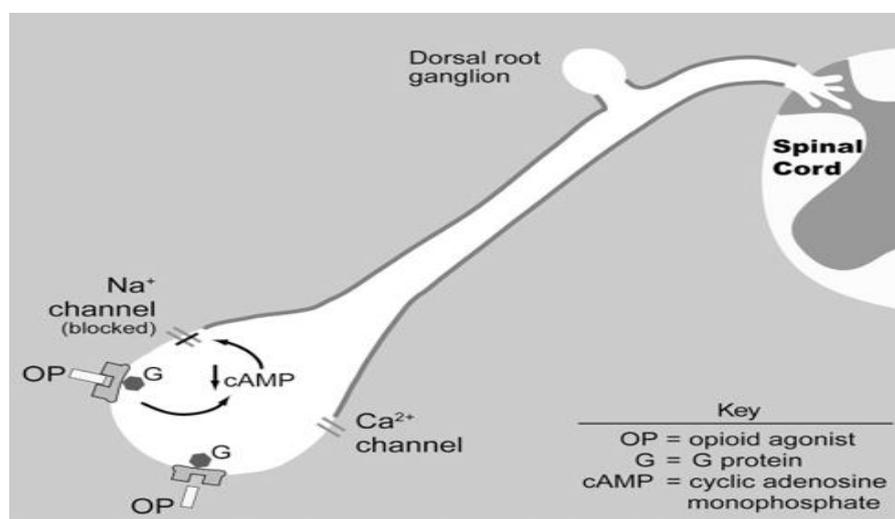


**Figura 2** – Mecanismos de acção do tramadol. (Adaptado de: www.Grunenthal.com).

O tramadol liga-se a receptores que normalmente são activados por substâncias denominadas opióides endógenos, tais como encefalinas,  $\beta$ -endorfinas e dinorfinas.

Os receptores opióides encontram-se em diferentes regiões cerebrais e na espinal-medula, bem como nos plexos nervosos intramurais (responsáveis pela motilidade intestinal) (Lullmann, 2000).

Existem diferentes tipos de receptores opióides, sendo os mais importantes os  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ , pertencendo todos ao grupo de receptores ligados à proteína-G, o que leva à alteração de outras proteínas, nomeadamente canais iónicos transmembranares (Figura 3). Ocorre, assim, um aumento da permeabilidade membranar ao  $K^+$  e diminuição do influxo de  $Ca^{2+}$  para os terminais nervosos, levando a uma diminuição da libertação de neurotransmissores relacionados com a dor (substância P e glutamato) e da actividade sináptica por eles induzida (Lullmann, 2000).



**Figura 3** – Acção opióide do Tramadol na transmissão dos impulsos nervosos da dor; (Adaptado de: [www.Medscape.com](http://www.Medscape.com)).

A molécula de tramadol apresenta alguma selectividade para o receptor  $\mu$  mas uma fraca selectividade para os receptores  $\kappa$  e  $\delta$ . A afinidade para o receptor  $\mu$  é aproximadamente 10 vezes inferior à da codeína e 6000 vezes inferior à da morfina (daqui resulta a baixa eficácia do antagonista opióide, naloxona). Já o seu principal metabolito O-desmetiltramadol (M1) apresenta, em modelos animais, uma potência analgésica 6 vezes superior ao tramadol e uma ligação aos receptores  $\mu$  200 vezes superior (ECDD, 2006).

As formas comerciais de tramadol apresentam uma mistura racémica de dois enanteómeros da molécula, o (+)-tramadol e o (-)-tramadol, isto é, encontram-se em

igual concentração. O enantiómero (+)-tramadol é um agonista selectivo do receptor  $\mu$  e inibe a recaptção de serotonina, enquanto o (-)-tramadol inibe a recaptção de noradrenalina e estimula os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, mas apresenta uma baixa afinidade para os receptores  $\mu$  (Raffa, 1992). A acção do tramadol, como já foi referido, está também dependente da acção do seu metabolito M1, que se caracteriza por uma maior afinidade ao receptor  $\mu$ -opióide, sendo o maior responsável pela sua actividade opióide (Grond, 2004).

A eficácia do tramadol em situações dolorosas que normalmente não respondem aos opióides, tais como a dor neuropática, pode ficar assim explicada por este duplo mecanismo (opióide e não opióide), bem como a sua melhor tolerabilidade quando comparada com a dos opióides convencionais. Quando administrado, em doses consideradas terapêuticas, o tramadol tem poucos ou nenhuns efeitos sobre o sistema respiratório bem como sobre o sistema cardiovascular e gastrointestinal (Bambridge, 1998; Desmeules, 2000).

### 3.2 – Efeitos Farmacodinâmicos

O efeito analgésico do tramadol deve-se, então, à sinergia entre a mistura racémica e o seu metabolito M1 (ECDD, 2006).

A acção opióide do tramadol resulta da interacção com os receptores  $\mu$  opióides que se encontram em maior densidade no córtex cerebral, no tálamo e na substância cinzenta periaquedutal. Quando estimulados estes receptores, assiste-se a uma analgesia supra-espinhal, euforia, dependência física, tolerância, depressão respiratória, hipotermia, bradicardia e miose (Tavares, 2001). Uma vez que se trata de uma fraca ligação do tramadol a estes receptores, os seus efeitos secundários são menos intensos do que os provocados pelos opióides tradicionais, sendo sempre dependentes da dose administrada, bem como da via de administração.

Segundo alguns autores (Tavares, 2001), ao exercer um efeito analgésico através de dois mecanismos diferentes, opióide e não opióide, o efeito analgésico do tramadol é apenas parcialmente antagonizado pela naloxona.

Em termos de segurança de utilização, esta molécula ultrapassa largamente a de outros opióides (Liao, 1992).

O tramadol demonstrou ser útil na terapêutica da dor aguda relacionada com contracturas, fracturas, afecções ou cirurgias dentárias e no tratamento da dor crónica (osteo-articular, neuropática, cancerígena) (Williams, 1997).

A dor crónica é de difícil diagnóstico, apesar da formação dos médicos alertando para esta patologia e da existência de analgésicos eficientes para o seu tratamento (Max, 1990). Ao seleccionar um analgésico, a sua eficácia e a sua segurança são as características mais importantes a considerar pelo médico, enquanto ao doente interessa também, além destas características, a conveniência e o preço a pagar.

Na verdade, a selecção de um agente analgésico comporta um balanço entre a segurança da utilização e a sua eficácia (Thomas e Gibson, 1996). Enquanto em alguns pacientes a terapêutica analgésica pode ser eficaz, em muitos outros, a existência de efeitos secundários e a possibilidade de desenvolverem dependência e conduzirem a um abuso pode limitar a escolha do analgésico adequado e levar também a que os doentes não cumpram o seu tratamento correctamente, em especial quando se trata de dor crónica (McCaffrey, 1992; Leitman e col., 1994).

A terapêutica analgésica deve ser introduzida lentamente, adequando as dosagens de modo a que os efeitos adversos sejam mínimos, ponderando-se sempre todas as possibilidades farmacológicas e não farmacológicas disponíveis, compreendendo as implicações particulares e sociais da dor crónica não tratada (Thomas e Gibson, 1996).

### Efeitos respiratórios

A depressão respiratória é um dos principais efeitos secundários dos opióides já que estes provocam uma diminuição da sensibilidade do centro respiratório ao dióxido de carbono, o que resulta numa diminuição do volume “tidal”, ou volume corrente, e da frequência respiratória. Segundo diversos estudos, o tramadol, em doses terapêuticas (até 400 mg/dl), demonstrou uma menor capacidade para produzir depressão respiratória do que qualquer outro opióide. De qualquer modo, após a administração de doses excessivas (400-1000 mg/dl) pode provocar depressão respiratória potencialmente fatal (Lee e col., 1993; Lullmann H, 2000).

### Efeitos no Sistema Nervoso Central

Estudos em animais e em humanos indicam que a toxicidade do tramadol é dependente da dose, podendo resultar na indução do estado de coma, movimentos clónicos, diminuição da temperatura corporal, hipotonia, alucinações, náuseas, vômitos, bradicardia, convulsões, depressão respiratória e apneia. Outros depressores do sistema nervoso central, bem como antidepressivos que actuem na monoaminoxidase (MAO) podem exacerbar estes efeitos secundários (Lullmann, 2000)

Além destas situações, doentes epilépticos, com historial de convulsões ou com outros riscos de desenvolver convulsões (traumatismo craniano, álcool ou drogas), podem estar mais predispostos aos efeitos convulsivantes do tramadol (Williams, 1997).

### Efeitos Cardiovasculares

O tramadol pode aumentar o ritmo cardíaco e a pressão arterial sistólica e diastólica (Vogel e col., 1978; Barth e col., 1987). Estes efeitos resultam do efeito simpaticomimético dos opióides, não sendo clinicamente relevantes quando o tramadol é utilizado em doses consideradas terapêuticas por indivíduos saudáveis ou mesmo por doentes com problemas cardíacos.

### Efeitos no aparelho Gastrointestinal

Doentes medicados com tramadol referenciam alguns efeitos gastrointestinais, tendo sido os mais frequentes as náuseas, vômitos e obstipação, sendo que alguns demonstraram igualmente alterações de apetite (Ortho-McNeil Pharmaceuticals, 1995). Em doentes grávidas, o tramadol provocou mais efeitos eméticos do que a morfina ou a petidina (Prasertsawat e col., 1986).

Aparentemente, o tramadol não altera as funções musculares dos esfíncteres e não provoca alterações a nível pancreático e biliar (Staritz e col., 1986; Budd, 1994) e ainda assim, quando comparado com doses equivalentes de codeína, apresenta um potencial de obstipação consideravelmente inferior (Worz, 1984).

## Outros efeitos do Tramadol

Está referenciado que o tramadol, além das suas propriedades analgésicas, é capaz de produzir variadas respostas positivas, tais como de antitússico, antidepressivo, anti-inflamatório e imunoestimulador (Kukanich e Papich, 2004; Yalein e col., 2005).

## Tolerância

A tolerância é um estado de adaptação de um indivíduo após utilização de um determinado medicamento, resultando na diminuição de um, ou mais, dos efeitos por ele produzidos, ao longo do tempo ([www.ampainsoc.org](http://www.ampainsoc.org)).

O tramadol é geralmente bem tolerado, sendo a maior parte dos seus efeitos secundários pouco relevantes. De um estudo desenvolvido por Cossmann e Wilsman (1987) em 7198 utilizadores europeus de tramadol, constatou-se que 80,9% não relataram qualquer problema, 2,3% não deram qualquer informação e 16,8% sentiram reacções adversas ao medicamento. Dos que relataram efeitos secundários, 69% descreveram-nos como suaves, 22% graves e 9% não classificaram os efeitos que sentiram. Concluiu-se que estes efeitos secundários parecem estar relacionados com a dosagem e esquema terapêutico implementado, tendo sido, maioritariamente, relacionados com irritação do sistema nervoso central e problemas de coordenação (7,1%) (tonturas), efeitos sobre o sistema nervoso autónomo (3,3%) (boca seca) e efeitos sedativos (2,4%). Ocorreram náuseas em 4,8% dos utilizadores.

Efectivamente, outros estudos revelaram igualmente que as náuseas (10,3%) constituem um dos efeitos secundários mais frequentes, tendo, no entanto, sido observados nos primeiros três dias de tratamento e com diminuição após utilização prolongada (Rauck e col., 1994).

A utilização concomitante de outro tipo de medicação foi referida em 45% dos casos, medicação esta que pode ser relevante para o aparecimento ou potenciação de alguns dos efeitos secundários observados. É de ter em consideração que em apenas 6 dos pacientes foram relatadas reacções eufóricas, sendo que em apenas um caso foi considerada grave.

Note-se que, após 173 dias de tratamento não foi detectada nenhuma evidência de dependência química (Rauck e col., 1994).

### Dependência e Potencial de Abuso

Através da prática clínica, o tramadol demonstrou que o desenvolvimento de tolerância e/ou de dependência não é muito comum (Budd, 1994). Os estudos desenvolvidos por Lee e col. (1993) demonstraram que ao longo do tempo o efeito analgésico do tramadol não diminui, nem há necessidade de aumentar o seu consumo em situações de dor aguda ou crónica. Simultaneamente, parece que o tramadol apresenta um baixo potencial de desenvolvimento de dependência, embora quando utilizado durante um longo período de tempo essa possibilidade não deva ser afastada (Lee e col., 1993).

Quando avaliado o efeito miótico de uma dose intramuscular única de tramadol (75 e 150mg), quando comparada com o efeito da morfina e do placebo, os efeitos obtidos foram semelhantes aos do placebo (Preston e col., 1991). Também os efeitos psicotrópicos do tramadol foram avaliados por Huber (1978), tendo demonstrado que não são muito diferentes do efeito do placebo, quando utilizado durante um curto espaço de tempo. Estes resultados indicam um baixo potencial de dependência psicológica deste fármaco, comprovados também pela comparação feita por Lee e col. (1993), que refere uma taxa de abuso relatada de 0,23 por milhão de dose unitária, sendo para a codeína uma taxa de 7,9 e para a di-hidrocodeína uma taxa de 10. Este baixo potencial de abuso e dependência demonstrado pelo tramadol pode estar relacionado com a sua fraca ligação aos receptores opióides e com o seu mecanismo de acção alternativo.

Em 5 milhões de utilizadores nos Estados Unidos, apenas foram relatados 115 casos de abuso, dependência, desistência da terapêutica, ou *overdose* intencional (The RW Johnson Pharmaceutical Research Institute, 1992).

No entanto, deve ser sempre de considerar o início de uma terapêutica com tramadol em doentes com um historial de dependência a analgésicos opióides (Williams, 1997).

## 4 – TOXICOCINÉTICA

### 4.1 – Absorção

Tal como acontece com todas as moléculas, a absorção do tramadol depende da via de administração. No mercado português só estão disponíveis formas de administração oral (comprimidos, cápsulas e gotas), injectável e rectal (supositórios) (I.N.T., 2009).

Após a administração de uma injeção intramuscular, o tramadol é absorvido rapidamente e por completo, sendo a sua concentração plasmática máxima ( $C_{\text{máx}}$ ) atingida logo após 45 minutos e sua a biodisponibilidade de praticamente 100% (www.Grunenthal.com).

Quando administrado por via oral, o racemato de tramadol é absorvido rapidamente ( $0,38 \pm 0,18\text{h}$ ) e quase por completo (Bianchi, 1999; www.Grunenthal.com). Após a administração oral de uma dose de 100 mg, a média da biodisponibilidade absoluta é de, aproximadamente, 75% (Daily Med, 2004), sendo que, após administração de doses múltiplas a biodisponibilidade pode atingir valores próximos dos 100% (Malonne, 2003), provavelmente devido a uma saturação do mecanismo de metabolização hepática (ECDD, 2006). Comparado com outros analgésicos opióides, a sua biodisponibilidade, quando administrado em cápsulas, é extremamente elevada (www.Grunenthal.com).

A Tabela 1 apresenta alguns parâmetros farmacocinéticos do tramadol e do seu principal metabolito (M1), destacando-se que a  $C_{\text{máx}}$  de tramadol é atingida, em média, duas horas após a sua administração oral, enquanto que a do seu principal metabolito é atingida ao fim de três horas, em indivíduos adultos saudáveis. Quando administradas formas de libertação prolongada, a  $C_{\text{máx}}$  é atingida perto das 5h, permitindo um efeito mais prolongado (Daily Med, 2004).

A farmacocinética do tramadol, quando administrado em comprimidos orodispersíveis e em gotas, é muito semelhante à das cápsulas, sendo que apenas se destaca uma diferença de 10% na  $C_{\text{máx}}$  entre as cápsulas e os comprimidos orodispersíveis. Este nível plasmático é atingido quando administrado sob a forma de gotas 1 hora após a administração, 1,5 horas para os comprimidos e 2,2 horas para as cápsulas, reflectindo a rápida absorção das formas líquidas orais. Já para os

supositórios a biodisponibilidade absoluta atinge, em média, valores perto dos 80% (www.Grunenthal.com).

A administração oral do cloridrato de tramadol concomitantemente com alimentos não afecta nem a velocidade de absorção nem a quantidade absorvida, não havendo, assim, restrições à sua administração à refeição ou fora da refeição (Daily Med, 2004).

**Tabela 1** – Parâmetros farmacocinéticos do tramadol e do seu principal metabolito M1 (**Posologia:** DU= dose única; DM= dose múltipla; a.o.= administração oral; q.i.d.= quatro vezes por dia; c – Não foi avaliado) (*Adaptado de:* Daily Med, 2004).

População / Posologia	Molécula/ Metabolito	C <sub>máx</sub> (ng/ml)	Tempo de C <sub>máx</sub> (h)
Adultos Saudáveis, 100mg / q.i.d., DM a.o.	Tramadol	592	2,3
	M1	110	2,4
Adultos Saudáveis, 100mg / DU a.o.	Tramadol	308	1,6
	M1	55	3,0
Idosos, (> 75 anos) 50mg / DU a.o.	Tramadol	208	2,1
	M1	c	c
Insuficiência Hepática, 50mg / DU a.o.	Tramadol	217	1,9
	M1	19,4	9,8

## 4.2 – Distribuição

O tramadol é rapidamente distribuído pelo organismo, tendo um tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) de distribuição na fase inicial de 6 minutos, seguido de uma fase de distribuição mais lenta, com um  $t_{1/2}$  de 1,7 horas (Lee e col., 1993).

O seu volume de distribuição após a administração intravenosa de 100 mg é, em média, de 2,6 L/kg para indivíduos do sexo masculino e de 2,9 L/kg para indivíduos do sexo feminino. O cloridrato de tramadol apresenta um baixo índice de ligação às proteínas plasmáticas, aproximadamente 20%, sendo independente da dose até aos 10 µg/ml de sangue. A saturação das proteínas plasmáticas ocorre apenas quando são atingidas concentrações superiores ao limite considerado terapêutico (Daily Med, 2004).

O tramadol apresenta uma elevada afinidade para os tecidos ( $V_{d,\beta}=203\pm 40l$ ) e tem a capacidade de passar a barreira hematoencefálica. Apenas uma pequena fracção da dose de tramadol administrado é encontrada no leite materno (0,1%) e o mesmo se passa com o seu principal metabolito *o*-desmetilado (0,02%) (www.Grunenthal.com).

### 4.3 – Metabolismo

O metabolismo do tramadol ocorre, principalmente, a nível hepático. Aproximadamente 30% da dose, quando administrada oralmente, é eliminada inalterada na urina, sendo o restante sujeito a metabolização hepática (Daily Med, 2004).

A metabolização hepática é principalmente de primeira passagem, podendo seguir duas vias metabólicas distintas, envolvendo os isoenzimas CYP3A4 e CYP2D6. Uma dá origem ao metabolito farmacologicamente activo, *O*-desmetiltramadol (M1), a outra origina o *N*-desmetiltramadol (M2), metabolito este que é inactivo. Note-se que ambas ocorrem através de reacções de fase I. A formação de um ou de outro estará dependente da concentração hepática de Citocromo P450 CYP2D6 que, quando é elevada, favorece a formação de M1. Através destas reacções de fase I, como pode ser observado na figura 4, podem ainda surgir o *N*-didesmetiltramadol (M3), o tri-*N,O*-desmetiltramadol (M4) e o *N,O*-didesmetiltramadol (M5) (ECDD, 2006). Os metabolitos *o*-desmetilados podem ainda sofrer reacções de conjugação (ácido glucorónico) e de sulfatação (ácido sulfúrico), antes de serem eliminados pela urina (Lintz e col., 1981).

Através de um estudo do Departamento de Farmacologia Bioquímica da Grünenthal (Gillen e col., 2000), com o objectivo de caracterizar a ligação do tramadol e seus metabolitos aos receptores  $\mu$ -opióides, concluiu-se que o metabolito (+)-M1 é responsável pelo efeito analgésico, já que é o que apresenta maior afinidade para estes receptores. Em seguida, os que apresentaram maior afinidade foram o ( $\pm$ )-M5, o (-)-M1, e o ( $\pm$ )-tramadol, por ordem decrescente.

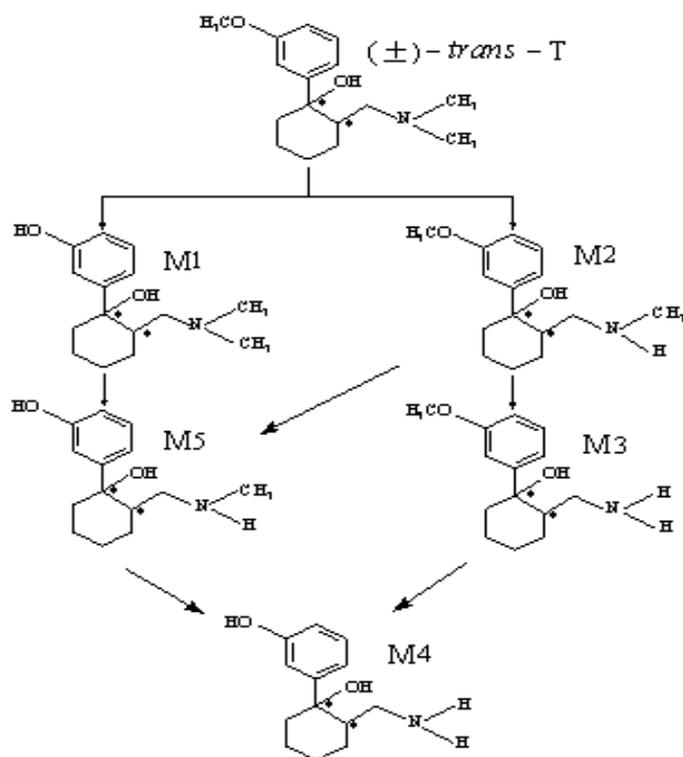


Figura 4 – Metabolismo do tramadol; (Adaptado de: LIU Hui-Chen, 2003 Jan).

O metabolismo do cloridrato de tramadol pode ser afectado por diversos factores, tais como a funcionalidade hepática, o uso concomitante de outros fármacos metabolizados através das mesmas vias metabólicas, ou mesmo a idade e o sexo do indivíduo.

Aproximadamente 7% da população mundial apresenta uma actividade reduzida do isoenzima CYP2D6 do citocromo P-450, o que se traduz numa fraca capacidade metabólica de diversos medicamentos entre os quais o tramadol e a amitriptilina (antidepressivo tricíclico), levando a um aumento da concentração de tramadol em cerca de 20% enquanto ocorre uma diminuição de cerca de 40% na concentração plasmática de M1, quando comparado com indivíduos que não têm qualquer deficiência enzimática. O mesmo acontece em doentes com cirrose em estado avançado.

Do mesmo modo, o uso de outros fármacos metabolizados com recurso aos mesmos isoenzimas, podem também alterar o perfil farmacocinético do tramadol. Fármacos como a fluoxetina (antidepressivo), quinidina (antiarrítmico) e

amitriptilina conduzem, segundo estudos *in vitro*, a um aumento da concentração plasmática de tramadol e a uma diminuição da concentração de M1 (Daily Med, 2004). Já a carbamazepina, devido à sua capacidade hepatoestimuladora, obriga a uma adaptação da dose administrada de tramadol, uma vez que pode reduzir para metade o seu tempo de semi-vida (ECDD, 2006).

Em indivíduos com idades compreendidas entre os 65 e 75 anos, não se verifica uma alteração relevante nos valores das concentrações plasmáticas de tramadol. No entanto, em indivíduos com idades superiores a 75 anos, ocorre um ligeiro aumento do tempo de meia-vida de 6 para 7 horas.

Em indivíduos de sexos diferentes verificou-se que, após a administração de uma dose única de 100 mg i.v., nos do sexo feminino o pico de concentração foi superior em 12% e a área sob a curva (AUC) concentração plasmática *versus* tempo (de t=0 a t=∞), foi 35% superior, quando comparados com os do sexo masculino (Daily Med, 2004) . Quando administrada uma dose de 100 mg, por via oral, rapidamente se atinge a concentração máxima. No entanto, após uma administração múltipla da mesma dosagem, o tempo de C<sub>máx</sub> é ligeiramente prolongado, mas a biodisponibilidade do tramadol aumenta significativamente (Tabela 2). Este aumento é também visível após a administração intravenosa ou intramuscular de tramadol (Tabela 2).

Todas estas situações devem ser consideradas, já que podem conduzir a um aumento dos riscos de manifestação de efeitos secundários do tramadol.

**Tabela 2** – Dados farmacocinéticos do tramadol e do seu metabolito M1 após a administração oral, intravenosa e intramuscular; C<sub>máx</sub> (concentração plasmática máxima), t<sub>máx</sub>( tempo em que atinge a concentração máxima), AUC (área sob a curva de concentração vs tempo de t=0 a t=∞). (*Adaptado de:* Scott and Perry, 2000).

Parâmetro	Dose oral única de 100mg		Dose oral múltipla de 100mg		i.v. 50mg	i.m. 50mg
	Tramadol	M1	Tramadol	M1	Tramadol	Tramadol
C <sub>max</sub> (µg/l)	308	55	592	110	347,4	193
t <sub>max</sub> (h)	1,6	2,97	2,25	2,43	-	0,75
AUC (µg/l*h)	2649	722	3679	835	1556	1582

#### 4.4 – Eliminação

A eliminação do tramadol e dos seus metabolitos é realizada quase por completo através dos rins, sendo a fracção excretada através da bÍlis quase negligenciável (Lintz e col., 1981). Paar e colaboradores, em 1997, após a administração oral de uma dose de 50 mg de tramadol a 104 voluntários, detectaram uma excreção na urina de 12% de tramadol, 15% de M1 e 4% de M2 ao longo de um período de 24h.

Aproximadamente 90% da dose de tramadol administrada é recuperada através da urina, quer na sua forma inalterada (30%) quer sob a forma de metabolitos (60%), sendo a restante porção eliminada através das fezes.

A eliminação do tramadol pode ser descrita por um modelo farmacocinético bicompartimental (primeiramente, distribuição simultânea com eliminação até ao equilíbrio de concentrações entre o compartimento vascular e tecidular, seguindo-se apenas a fase de eliminação a partir destes dois compartimentos) em que o tempo de semi-vida do tramadol, após administração oral, é de aproximadamente 5,1 horas, sendo o do metabolito M1 ligeiramente superior, 9 horas (Malonne, 2003).

A eliminação plasmática do racemato de tramadol, bem como do seu metabolito M1 sofre um aumento de cerca de 1 hora após a administração de doses múltiplas (Daily Med, 2004).

Após administração intravenosa (i.v.), a clearance total média do tramadol é de cerca de 467 ml/min ( $\pm 28$  l/h), enquanto que após administração oral é de, aproximadamente, 710-742 ml/min ( $\pm 43-44$  L/h), com um tempo de meia vida de eliminação de 5-7 horas (Thomas e Gibson, 1996).

Em indivíduos com insuficiência hepática, a clearance renal sofre uma diminuição considerável, tal como pode ser observado na tabela 3, devido também à diminuição da capacidade de metabolização.

Assim, tal como acontece em indivíduos com falência hepática, em indivíduos com insuficiência renal deve ser efectuado um ajuste da dose administrada.

**Tabela 3-** Parâmetros de eliminação do tramadol e do seu principal metabolito M1 a – DU= dose única; DM= dose múltipla; a.o.= administração oral; i.v.= administração intravenosa; q.i.d.= quatro vezes por dia; b – Não se aplica; c – Não foi avaliado. (*Adaptado de:* Daily Med, 2004).

População / Posologia <sup>a</sup>	Molécula/ Metabolito	Clearance (ml/min/kg)	t <sub>1/2</sub> (h)
Adultos Saudáveis, 100mg qid, DM a.o.	Tramadol	5,9	6,7
	M1	b	7,0
Adultos Saudáveis, 100mg DU a.o.	Tramadol	8,5	5,6
	M1	b	6,7
Idosos, (>75 anos) 50mg DU a.o.	Tramadol	6,89	7,0
	M1	b	c
Insuficiência Hepática, 50mg DU a.o.	Tramadol	4,23	13,3
	M1	c	18,5
Insuficiência Renal CL <sub>cr</sub> 10-30ml/min, 100mg DU i.v.	Tramadol	4,23	10,6
	M1	b	11,5
Insuficiência Renal CL <sub>cr</sub> <5ml/min, 100mg DU i.v.	Tramadol	3,73	11,0
	M1	b	16,9



# Parte I

## *Capítulo II*

### *Amitriptilina*



## 1 – INTRODUÇÃO

Durante a sua pesquisa, no final dos anos 40, Hafliger e Schindler sintetizaram mais de 40 derivados iminodibenzílicos para potencial utilização como anti-histamínicos, sedativos, analgésicos e anti-parkinsonianos (Goodman e Gilman, 2006).

Um dos compostos sintetizados foi a imipramina (Fig 5a), um derivado benzodiazepínico que difere das fenotiazidas (Fig. 5b) pela substituição do enxofre por uma ligação que forma um anel central de sete carbonos, semelhante ao dos antipsicóticos diazepínicos (Goodman e Gilman, 2006).

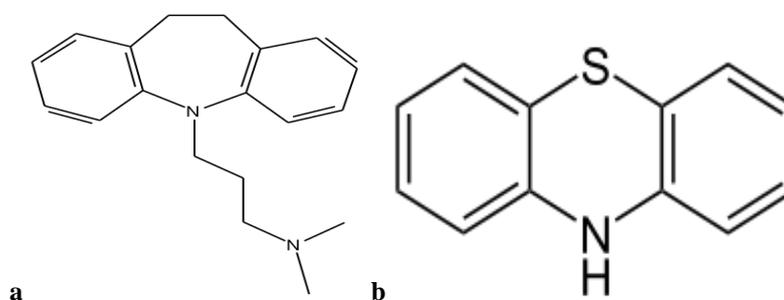


Figura 5 – a) Imipramina; b) Fenotiazida.

A imipramina demonstrou, durante os ensaios desenvolvidos por Khun em 1958, que não tinha propriedades sedativas em doentes psicóticos, mas demonstrou eficácia em doentes deprimidos (Potter e col., 1998; Thase e Nolen, 2000; Kragh-Sorensen e Stage, 2004).

Durante a pesquisa de compostos análogos à imipramina, foram desenvolvidas diversas moléculas caracterizadas pela sua estrutura de três anéis, com variações essencialmente na cadeia lateral. Todos estes compostos demonstraram propriedades farmacológicas e clínicas comuns, sendo agrupados como antidepressivos tricíclicos (Thase e Nolen, 2000).

Os antidepressivos tricíclicos mais antigos com uma cadeia lateral amino-terciária, como a amitriptilina, bloqueiam a captação neuronal da serotonina e da noradrenalina (Thase e Nolen, 2000).

A amitriptilina foi introduzida no mercado em 1961 (Ayd, 1961). A companhia farmacêutica Merck contratou um grupo de investigadores americanos

para se dedicarem ao estudo da amitriptilina, já que apresentava uma estrutura química idêntica à da imipramina. Esta última é uma molécula com uma estrutura tricíclica, desenvolvida no início da década de 50, e que depois de vários anos de avanços e recuos foi lançada para o mercado, como antidepressivo e antimelancólico, em 1957 na Suíça (Healy, 1997).

Em 1960, um dos investigadores americanos, Frank Ayd, sugeriu à Merck a realização de um ensaio clínico utilizando a amitriptilina em doentes deprimidos, que viria a revelar resultados bastante positivos. Este investigador havia já escrito um livro com o título “Recognizing the Depressed Patient”, onde sugeria que a depressão era uma patologia que podia ser reconhecida não só em asilos, mas também na prática clínica de ambulatório. Assim, a Merck aproveitou ambas as ideias e divulgou-as por entre a classe médica o mais rápido que conseguiu, vendendo não só o produto mas também a ideia, tornando a amitriptilina no primeiro antidepressivo vendido em grandes quantidades (Kragh-Sorensen, 2004).

Este grupo de fármacos continuou com um grande consumo até ao aparecimento, nos anos 80, dos Inibidores Selectivos da Recaptação de Serotonina (ex. fluoxetina) (Healy, 1997).

Em Portugal, esta molécula tem sofrido um ligeiro decréscimo nos últimos cinco anos (Tabela 4), contrariando um pouco a tendência do mercado dos antidepressivos.

**Tabela 4** – Evolução do número de embalagens de amitriptilina e do grupo dos antidepressivos, em Portugal, nos últimos 5 anos. (*Adaptado de: IMS, Fevereiro de 2009*).

	2004	2005	2006	2007	2008
Amitriptilina	382 073	375 569	363 952	359 188	360 113
Antidepressivos	1 971 556	2 004 770	2 001 453	1 994 423	2 105 831

A amitriptilina é uma amina terciária tricíclica que actua como antidepressivo. O modo como os antidepressivos tricíclicos exercem o seu efeito clínico é ainda pouco conhecido, mas ainda assim, já demonstraram actividade na recaptação de diferentes neurotransmissores ao nível da sinapse, incluindo a

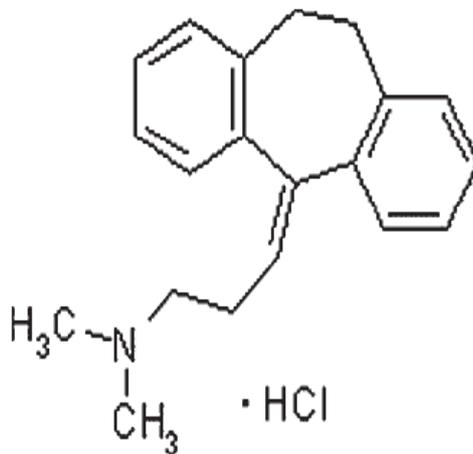
serotonina e noradrenalina, potenciando e/ou prolongando, assim, os seus efeitos, já que a sua recaptação é essencial para a supressão dos seus efeitos (RxMed, 2004).

A amitriptilina demonstra uma forte actividade anticolinérgica e vários efeitos a nível cardiovascular, tais como hipotensão ortostática e arritmias. Tal como acontece com outros antidepressivos, são necessárias várias semanas de tratamento para que possa exercer o efeito desejado (RxMed, 2004).

## 2 – ESTRUTURA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Amitriptilina é a denominação comum internacional (DCI) da molécula 3-(10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,b]ciclopentil-5-dieno)-propildimetilamina. O cloridrato de amitriptilina (Fig.6) apresenta um peso molecular de 313.9 e um ponto de fusão no intervalo de temperaturas 196-197°C (Pharmacopeia Europeia, 2005).

A Ph. Eur. refere que o cloridrato de amitriptilina é solúvel em água, ao contrário da sua base livre e a uma temperatura de 25°C, apresenta uma solubilidade mínima de  $2.0 \times 10^{-3}$  mg/ml, sendo o pKa de 9,45. Esta solubilidade altera-se também com o pH (Tabela 5).



**Figura 6** – Cloridrato de amitriptilina. Adaptado de: Manzo e col., 2006.

A amitriptilina é uma molécula altamente lipofílica apresentando um coeficiente de partilha octanol/água de 3,0 a 24°C (The Pharmaceutical Codex, 1994).

**Tabela 5** – Solubilidade do cloridrato de amitriptilina a 25° C a diferentes valores de pH e razão concentração/solubilidade para comprimidos com diferentes dosagens. (*Adaptado de:* Manzo e col., 2006).

pH	Solubilidade Calculada (mg/ml)	Razão Concentração/Solubilidade (ml) para comprimidos com diferentes dosagens					
		10 mg	25 mg	50 mg	75 mg	100 mg	150 mg
7,5	0,18	55	139	277	416	555	832
6,8	0,90	11	28	56	84	112	168
4,5	178	0,06	0,14	0,28	0,42	0,56	0,84
1,2	1000	0,01	0,025	0,05	0,075	0,10	0,15

### 3 – PROPRIEDADES FARMACODINÂMICAS

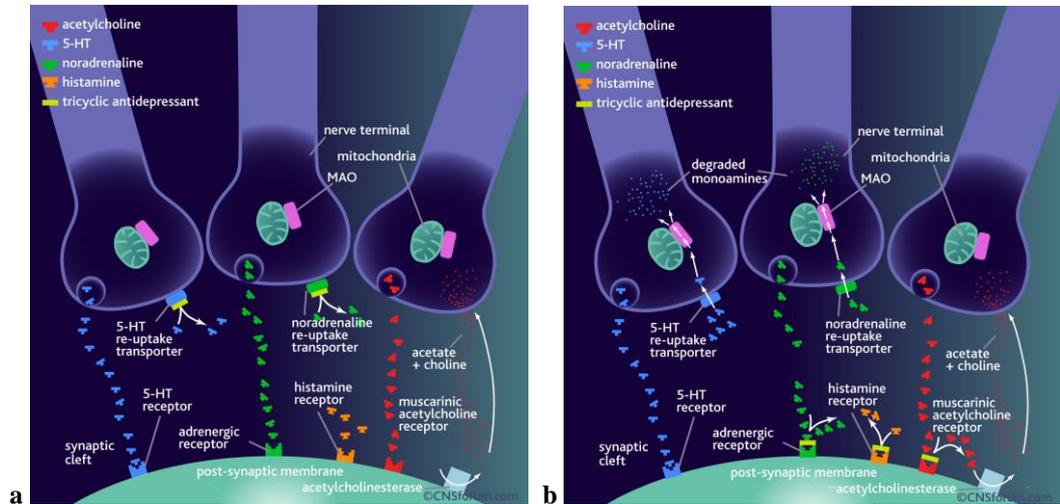
#### 3.1 – Mecanismo de Acção

A depressão é uma patologia que tem uma elevada prevalência e é, portanto, uma importante causa de incapacidade. No entanto, existem actualmente terapêuticas eficazes, pelo que se pode considerar curável, ou pelo menos controlável, na grande maioria dos casos. Neste contexto, assumem grande importância os antidepressivos do sistema nervoso central (SNC), normalizando o estado do humor quando este se encontra deprimido (não actuam quando o estado de humor é normal), distinguindo-se, por isso, dos psicoestimulantes (Potter e col, 1998).

As causas da depressão não estão ainda bem esclarecidas, existindo, no entanto, evidências de que se encontra relacionada com uma diminuição da concentração de noradrenalina e de serotonina ao nível das sinapses do SNC (ou um desequilíbrio entre ambos). Estes neurotransmissores, em particular a serotonina, são especialmente abundantes nas regiões do cérebro associadas ao controlo do humor e das emoções, como o sistema límbico e o tronco cerebral superior (Freudenrich, <http://health.howstuffworks.com/healthillness/treatment/medicine/medications/antidepressant.htm>).

Assim, os métodos utilizados para combater a depressão baseiam-se em mecanismos que levam ao aumento dos níveis de serotonina e/ou noradrenalina, quer

seja por inibição da sua biotransformação enzimática (MAO e COMT) ou inibindo a sua recaptação ao nível pré-sináptico (Freudenrich, <http://health.howstuffworks.com/healthillness/treatment/medicine/medications/antidepressant.htm>).



**Figura 7** – a) Mecanismo de acção de antidepressivos tricíclicos; b) Mecanismos responsáveis pelos efeitos secundários dos antidepressivos tricíclicos. (Adaptado de: CNSforum, 2005)

Muitos estudos têm demonstrado que os antidepressivos tricíclicos, quando comparados com outras classes de medicamentos antidepressivos, apresentam melhores resultados no tratamento de depressões major (Healy, 1997; Kirsch e Sapirstein, 1998; Parker, 2001; American Psychiatric Association, 2002; Kirsch e col., 2002; Moncrieff, 2002; Thase, 2002; Walsh e col., 2002; Zimmerman e col., 2002; Baldwin, 2003).

Os antidepressivos tricíclicos, ao inibirem a recaptação de diferentes neurotransmissores, incluindo a serotonina e a noradrenalina, a nível sináptico (RxMed, 2004) (Fig. 7a), podem potenciar os efeitos destes neurotransmissores. A amitriptilina tem também uma marcada actividade anticolinérgica através da ligação aos receptores muscarínicos (Fig. 7b). A sua capacidade antidepressiva pode estar relacionada com apenas um ou com todos os efeitos por si provocados. Ainda assim, a sua actuação no sistema monoaminérgico parece ser a mais importante (RxMed, 2004).

Os antidepressivos tricíclicos que actuam no transporte de noradrenalina não bloqueiam directamente o transporte de dopamina e, por essa razão, diferem dos estimulantes do SNC, como a cocaína ou as anfetaminas. No entanto, estes fármacos podem facilitar indirectamente os efeitos dopaminérgicos, inibindo parcialmente a recaptação de dopamina. Concomitantemente, estes fármacos podem também dessensibilizar os receptores  $D_2$ , por mecanismos desconhecidos (Potter e col, 1998).

Além da influência da amitriptilina sobre o transporte de noradrenalina, é também de referir a interacção marcada que estabelece com os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, menos acentuada com os receptores  $\alpha_2$  e praticamente nula com os receptores  $\beta$ . A interacção com estes receptores é fundamental para a resposta às quantidades de noradrenalina disponíveis na sinapse (Foote e Aston-Jones, 1995).

Ao ligar-se aos receptores  $\alpha_2$ , a amitriptilina limita a actividade neurofisiológica dos neurónios noradrenérgicos, reduz a síntese de noradrenalina e inibe a libertação deste neurotransmissor, por supressão das correntes de cálcio dependentes da voltagem e por activação de correntes de potássio controladas por receptores acoplados a proteína G (Foote e Aston-Jones, 1995). Por exposição repetida ao fármaco e à noradrenalina, os receptores  $\alpha_2$  ficam dessensibilizados (Chaput e col., 1991) e depois de alguns dias ou semanas, essa adaptação permite que a produção e a libertação de noradrenalina voltem a níveis basais, ou mesmo que atinjam níveis mais elevados (Foote e Aston-Jones, 1995).

Nos receptores  $\beta$ -adrenérgicos pós-sinápticos pode ocorrer dessensibilização após a administração de amitriptilina, bem como de outros antidepressivos (Sulser e Mobley, 1980). O possível efeito antidepressivo da acção sobre este receptor deverá estar relacionado com a perda de influência  $\beta$ -adrenérgica inibitória sobre os neurónios serotoninérgicos levando a um aumento da libertação de serotonina (Wamsley e col., 1987; Leonard e Richelson, 2000).

No receptor pós-sináptico  $\alpha_1$ -adrenérgico, a acção inicial da amitriptilina, parece consistir no bloqueio parcial do receptor o que poderá ser responsável pelos efeitos hipotensores deste fármaco. No entanto, após algum tempo de tratamento estes receptores ficam novamente disponíveis e possivelmente mais sensíveis à acção da noradrenalina. Por este motivo, à medida que aumenta a eficácia antidepressiva do medicamento, a inactivação da recaptação do neurotransmissor continua a ser bloqueada, a produção e libertação pré-sináptica de noradrenalina retomam os

índices basais ou podem até ultrapassá-los e um mecanismo  $\alpha_1$ -adrenérgico pós-sináptico entra em acção para assegurar a secreção funcional essencial (www.Medscape.com).

Além da interacção da amitriptilina com estes receptores há também estudos que referem a sua interacção com os receptores histamínicos, tendo a capacidade de os bloquear ( $H_1$  mais do que  $H_2$ ) (Tavares, 2001). Este bloqueio é responsável pela actividade sedativa da amitriptilina.

Em modelos animais verificou-se, igualmente, que a amitriptilina não inibe a monoaminoxidase (enzima responsável pela degradação da serotonina e da noradrenalina) (www.Medscape.com).

### 3.2 – Efeitos Farmacodinâmicos

Os antidepressivos tricíclicos são utilizados no tratamento de distúrbios depressivos major. Segundo os critérios estabelecidos pelo quarto manual estatístico de diagnóstico de doenças mentais (DSM-IV), uma depressão pode ser considerada major desde que apresente pelo menos 5 dos seguintes critérios (sendo pelo menos um deles a perda de prazer, ou de interesse e apresentar um estado depressivo) (www.Medscape.com):

- a) Maior parte do dia apresentando um estado depressivo (sentimento de tristeza ou vazio), avaliado pelo próprio ou por terceiros;
- b) Diminuição do interesse nas actividades diárias;
- c) Variação significativa de peso (5% do peso num mês) e do apetite;
- d) Insónia ou hipersónia;
- e) Agitação ou depressão psicomotora (geralmente detectado por terceiros);
- f) Cansaço ou perda de energia;
- g) Sentimentos de culpa e de autodepreciação excessivos ou inapropriados;
- h) Diminuição da capacidade de raciocínio, de concentração e de decisão;
- i) Pensamentos recorrentes sobre a morte e suicídio, ou tentativa de suicídio.

A terapêutica de uma depressão consiste, geralmente, numa fase aguda de remissão, seguida de uma fase de continuação e, por último, por uma fase de manutenção. Deve, no entanto, ser sempre adaptada ao doente em causa, tendo em consideração não só os factores clínicos da depressão, mas também outras perturbações psiquiátricas e outras patologias adjacentes (www.Medscape.com).

Os antidepressivos tricíclicos, devido ao seu potencial de desenvolvimento de efeitos secundários frequentes (em especial efeitos anticolinérgicos, efeitos cardiovasculares e aumento de peso) podem, por vezes, ser preteridos em relação a outros antidepressivos (www.Medscape.com).

### Tolerância e Dependência

A amitriptilina, tal como outros antidepressivos tricíclicos, tendem a desenvolver diversos efeitos secundários. Após um período prolongado de utilização de amitriptilina, os doentes adquirem alguma tolerância aos seus efeitos sedativos e autonómicos, assim como às náuseas iniciais (Gilman e Goodman, 1985).

Há relatos de dependência física por parte de doentes que utilizam antidepressivos tricíclicos, que se evidencia pelo aparecimento de mal-estar, calafrios, dores musculares e transtornos do sono, após a interrupção repentina do tratamento, principalmente quando são utilizadas doses elevadas (Schatzberg e col., 1997; Tollefson e Rosenbaum, 1998). Alguns efeitos da abstinência podem resultar da actividade colinérgica exacerbada depois da inibição provocada pela amitriptilina. Foram também relatadas reacções de agitação ou mania, após a interrupção súbita do tratamento com antidepressivos tricíclicos, podendo estar relacionadas com a reactivação dos mecanismos serotoninérgicos (Viguera e col., 1998; Baldessarini e col., 2001).

### Efeitos cardiovasculares

Os antidepressivos tricíclicos estão geralmente associados ao aparecimento de hipotensão ortostática, bem como de outro género de efeitos cardiovasculares. Entre eles destacam-se as alterações provocadas nos padrões de electrocardiogramas (alterações na onda T), alterações na condução atrioventricular, várias arritmias

(palpitações, taquicardia, bradicardia, fibrilhação ventricular), síncope, colapso e mesmo morte súbita ([www.Medscape.com](http://www.Medscape.com)).

Fenómenos hipertensivos foram descritos durante cirurgias em doentes medicados com amitriptilina, devendo, nestes casos, ser suspenso o tratamento alguns dias antes do procedimento cirúrgico ([www.Medscape.com](http://www.Medscape.com)).

Estas situações estão relacionadas com efeito cardiotoxíco “quinidine-like” em conjunto com os seus efeitos anticolinérgicos e potenciação da noradrenalina.

Assim, doentes com problemas cardíacos são especialmente sensíveis à cardiotoxicidade da amitriptilina ([www.Medscape.com](http://www.Medscape.com)).

### Efeitos ao nível do SNC

A maior parte dos antidepressivos tricíclicos provoca frequentemente sedação, o que por vezes pode ser considerada uma vantagem em relação a outros grupos terapêuticos, por exemplo em doentes deprimidos com insónias ([www.Medscape.com](http://www.Medscape.com)).

Tendo a capacidade de estabelecer ligação com os receptores H<sub>1</sub> (mais forte do que com os H<sub>2</sub>) a amitriptilina provoca depressão do SNC, sedação e pode provocar aumento de peso ([www.Medscape.com](http://www.Medscape.com)).

Estão também relatadas situações de tonturas provocadas pela amitriptilina, bem como de fraqueza, letargia e fadiga. Fenómenos de confusão, diminuição da concentração, desorientação, delírios e alucinações podem também ocorrer, mas geralmente estão associadas à utilização por doentes geriátricos. Ao actuar sobre a recaptação de serotonina pode também causar ansiedade ([www.Medscape.com](http://www.Medscape.com)).

Alguns sintomas extrapiramidais foram também referidos, incluindo movimentos involuntários anormais e discinesia tardia. Tal como pode acontecer com o consumo de neurolépticos, a amitriptilina pode levar à síndrome neuroléptica maligna, potencialmente fatal, devendo ser suspensa a sua utilização de imediato ([www.Medscape.com](http://www.Medscape.com)).

## Outras aplicações terapêuticas da amitriptilina

### *Pânico*

Os antidepressivos tricíclicos têm demonstrado alguma eficácia no tratamento da síndrome de pânico, com ou sem agorafobia, apesar do mecanismo através do qual desenvolvem este efeito antipânico não estar totalmente esclarecido. Pensa-se, no entanto, que não estará directamente relacionado com o seu efeito antidepressivo ([www.Medscape.com](http://www.Medscape.com)).

### *Deficit de atenção e hiperactividade*

Apesar de apresentarem um estreito intervalo de segurança (podem mesmo estar relacionados com alguns casos de morte súbita em crianças), os antidepressivos tricíclicos têm demonstrado eficácia no controlo de patologias como o deficit de atenção e hiperactividade em crianças e adolescentes. Estas moléculas são geralmente escolhidas como terapêutica de segunda linha, quando a terapêutica com estimulantes não é eficaz ou aconselhada. Também para a Síndrome de Tourette estes medicamentos têm demonstrado efeitos benéficos ([www.Medscape.com](http://www.Medscape.com)).

### *Enxaqueca*

A amitriptilina tem sido utilizada como profilático na enxaqueca. Sendo considerado o seu efeito como médio ou elevado e os seus efeitos adversos, suaves a moderados ([www.Medscape.com](http://www.Medscape.com)).

### *Enurese*

Alguns antidepressivos tricíclicos têm sido utilizados com eficácia no tratamento de enurese funcional, devendo, para tal, ser excluída qualquer outra causa orgânica, já que pode assim ser encoberta outra doença o tracto genitourinário ([www.Medscape.com](http://www.Medscape.com)).

### *Distúrbios alimentares*

A amitriptilina tem demonstrado eficácia principalmente em casos de bulimia nervosa, contribuindo para uma diminuição da frequência de impulsos para comer, vomitar e para purgas, bem como a diminuição de preocupação com a comida. A

acção dos tricíclicos nestas situações parece ser independente da melhoria do estado anímico destes doentes ([www.Medscape.com](http://www.Medscape.com)).

#### Efeitos ao nível do sistema nervoso periférico

A maior parte dos efeitos secundários relacionados com a utilização de amitriptilina resultam da sua actividade anticolinérgica (bloqueio dos receptores muscarínicos). Daqui resulta, por exemplo, a secura da mucosa bucal, visão turva provocada pela midriase e cicloplegia, aumento da pressão intraocular, hipertermia, obstipação e retenção urinária. Pode, também, provocar a diminuição da tonicidade do esfíncter esofágico inferior, levando ao aparecimento de refluxo gastro-esofágico ([www.Medscape.com](http://www.Medscape.com)).

## 4 – TOXICOCINÉTICA

### 4.1 – Absorção

A absorção da amitriptilina depende da via de administração. Em Portugal, a amitriptilina está disponível sob a forma de comprimidos, em dosagens de 10, 25 e 50 mg (I.N.T., 2009).

Os antidepressivos tricíclicos são, por norma, bem absorvidos quando administrados por via oral.

Quando a amitriptilina é administrada em doses elevadas, devido à sua marcada acção anticolinérgica, pode atrasar o trânsito intestinal e ampliar o tempo de esvaziamento gástrico, resultando daí uma absorção mais lenta ou variável do fármaco, podendo, por isso, complicar o tratamento de *overdoses* agudas.

Algumas horas após a administração, os níveis séricos de amitriptilina atingem o seu máximo (Goodman e Gilman, 1985), estando as concentrações máximas, no entanto, sujeitas a uma grande variabilidade interpessoal, devido às variações genéticas individuais responsáveis pela expressão dos isoenzimas do citocromo P450 ([www.Medscape.com](http://www.Medscape.com)) que são responsáveis pela sua metabolização.

A absorção da amitriptilina é passiva (Varma e col., 2005). No entanto, após a administração de comprimidos de amitriptilina, Burch e Herries (1983) e Burch e Hullin (1981) determinaram que 90% da dose administrada é absorvida, sendo a sua biodisponibilidade de  $48\% \pm 11$ , devido ao extenso metabolismo de primeira passagem a que é sujeita (Baldessarini, 2001).

### 4.2 – Distribuição

Após a sua absorção, os antidepressivos tricíclicos são amplamente distribuídos.

Estas moléculas são relativamente lipofílicas, ligando-se fortemente às proteínas plasmáticas e aos tecidos, resultando em volumes aparentes de distribuição entre 10-50 L/kg (Goodman e Gilman, 1985). Tanto a amitriptilina como o seu principal metabolito (nortriptilina) são distribuídos pelos pulmões, coração, cérebro e fígado ([www.Medscape.com](http://www.Medscape.com)).

Particularmente devido à estrutura de anel hidroxilado dos seus metabolitos, os antidepressivos tricíclicos apresentam uma grande afinidade para os tecidos cardíacos, potenciando assim os seus efeitos cardiotoxicos (Pollock e Perel, 1989; Prouty e Anderson, 1990; Wilens e col., 1992).

As concentrações séricas terapêuticas de amitriptilina podem encontrar-se entre os 100 e os 250 ng/ml (Perry e col., 1994). Já os seus efeitos tóxicos podem ocorrer com concentrações superiores a 500 ng/ml, enquanto níveis séricos na ordem de 1000 ng/ml podem mesmo ser fatais (van Harten, 1993; Burke e Preskorn, 1995; Catterson e col., 1997; Preskorn, 1997).

No entanto, estes níveis séricos de amitriptilina podem ter variações inter-individuais graças à acção dos isoenzimas do citocromo P450 (DeVane e Nemeroff, 2000).

### 4.3 – Metabolismo

A principal via metabólica da amitriptilina está muito dependente do metabolismo hepático oxidativo que ocorre por acção dos isoenzimas do citocromo P450 (Biggs e col., 1979; Prox e Breyer-Pfaff, 1987; Venkatakrisnan e col., 2001; Breyer-Pfaff, 2004).

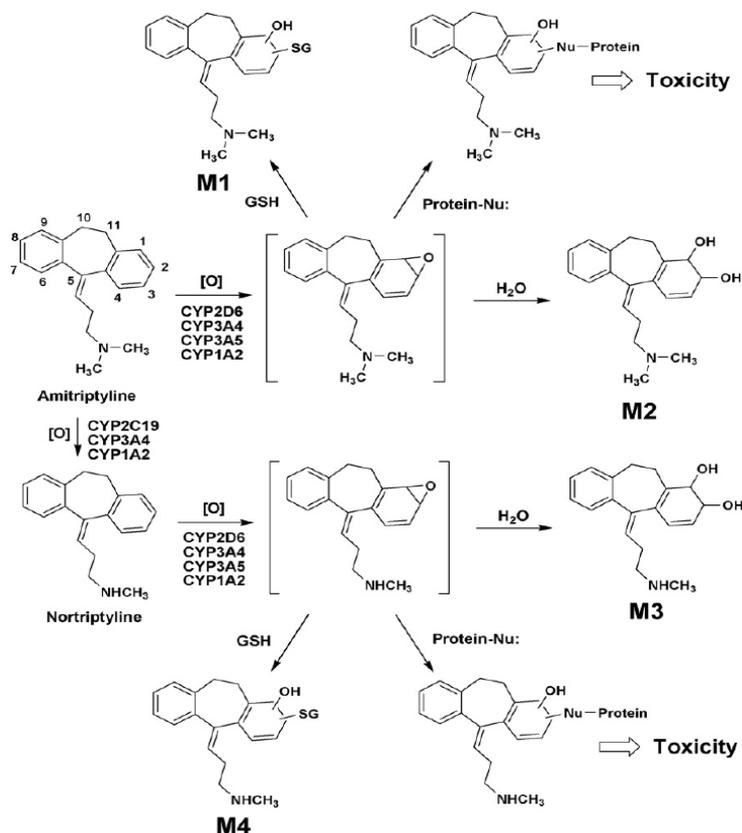
A amitriptilina sofre, a nível hepático, um metabolismo extenso, principalmente através de mecanismos de hidroxilação, *N*-desacetilação, *N*-oxidação e conjugação com o ácido glucorónico (Breyer-Pfaff, 2004) (Fig.8).

Quando ocorre a *N*-desacetilação dos antidepressivos tricíclicos, os seus derivados são farmacologicamente activos, podendo acumular-se em concentrações iguais ou superiores às da molécula mãe, contribuindo variavelmente para a actividade farmacodinâmica global (Breyer-Pfaff, 2004).

A conjugação dos metabolitos hidroxilados com o ácido glucorónico suprime toda e qualquer actividade biológica remanescente (Breyer-Pfaff, 2004).

Assim, por acção dos isoenzimas do citocromo P450, originam-se um epóxido de amitriptilina e a nortriptilina (esta também com efeitos antidepressivos e comercializada isoladamente). O epóxido pode reagir com o glutatião e formar o aducto M1, sofrer uma hidratação e formar o M2 que será eliminado na urina, ou atacar as proteínas celulares hepáticas, causando toxicidade hepática (rara). Uma via

metabólica semelhante é experimentada pela nortriptilina, podendo causar também efeitos hepatotóxicos graves, apesar de raros (Yang e Caldwell, 2004) (Fig. 8).



**Figura 8** – Vias metabólicas da Amitriptilina e do seu metabolito Nortriptilina. (Adaptado de: Wen e col., 2008).

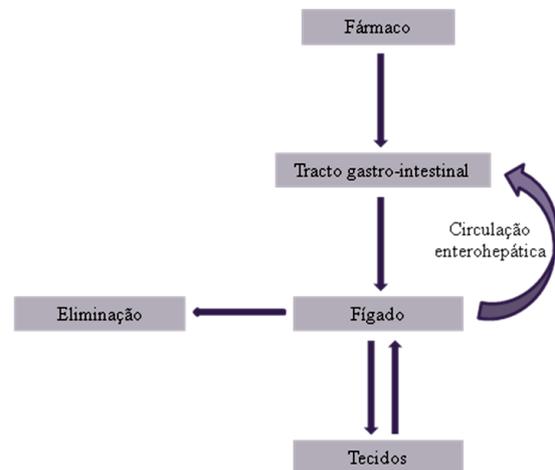
Após uma extensa metabolização hepática inicial a amitriptilina sofre um mecanismo metabólico denominado de circulação enterohepática (Fig. 9), aumentando ainda mais a sua metabolização (www.Medscape.com).

A inativação e eliminação da amitriptilina ocorre num intervalo de tempo que pode durar alguns dias e os seus metabolitos desmetilados podem atingir um tempo de meia vida de eliminação duas vezes superior (van Harten, 1993).

#### 4.4 – Eliminação

Metabolitos lipofílicos da amitriptilina, como os derivados *N*-desmetilados (nortriptilina), conseguem atravessar a barreira hematoencefálica e são farmacologicamente activos. Já os metabolitos obtidos por oxidação, hidroxilação e conjugação com ácido glucorónico, graças à sua polaridade, dificilmente atravessam a barreiras fosfolipídicas, tendo, por isso, uma baixa actividade farmacológica (Breyer-Pfaff, 2004).

A amitriptilina e os seus metabolitos estão sujeitos a uma circulação enterohepática, levando a que ocorra alguma eliminação através do sistema gastro-intestinal.



**Figura 9** – Mecanismo de circulação entero-hepática.

(Adaptado de: Despopoulos e Silbernagl, 1991).

Ao ocorrer a circulação enterohepática do fármaco e dos seus metabolitos, estes são eliminados, em parte, através da bÍlis, podendo ser novamente absorvidos através das paredes intestinais (Fig. 9). Este fenómeno leva a um aumento do tempo de meia-vida dos fármacos já que atrasam a sua eliminação definitiva (Burch e Hullin, 1981). Apenas uma pequena fracção de amitriptilina inalterada e dos seus metabolitos activos é excretada. Estes metabolitos, ao serem lipofílicos, são reabsorvidos quase na sua totalidade e sujeitos a novas reacções de metabolismo. Já os metabolitos polares são eliminados principalmente através da excreção urinária, podendo ser também encontrados nas fezes por eliminação através da bÍlis (www.Medscape.com). A amitriptilina apresenta, em média, um tempo de meia-vida de eliminação de 16 horas (30 horas para o seu metabolito nortriptilina) (Goodman e Gilman, 1985). Ao fim de 24 horas após a utilização de amitriptilina, cerca de 25-50% da dose administrada é excretada pela via urinária como metabolitos inactivos (Rxmed, 2004). A inactivação e completa eliminação da maioria dos antidepressivos ocorre depois de um intervalo de vários dias, sendo que a maioria dos antidepressivos tricíclicos é quase totalmente eliminada em 7-10 dias (Goodman e Gilman, 1985).



# Parte I

## *Capítulo III*

*Medicamentos e Condução*

*Rodoviária*



## 1 – INTRODUÇÃO

A condução é uma actividade diária e os acidentes de viação que daí advêm são uma das maiores causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo (Álvarez, 2002). O mesmo se pode constatar em Portugal, tal como se pode observar na Tabela 6.

**Tabela 6** – Acidentes com vítimas, feridos ligeiros, feridos graves e mortos no período de 2006 a 2008 em Portugal (a) – referente ao período de Janeiro a Novembro; (b) – referente ao período de Janeiro a Novembro e de 22 a 31 de Dezembro; (Fonte – ANSR, 2007 e 2008).

	2006	2007	2008
Acidentes	35680	35311	30683 <sup>(a)</sup>
Feridos Ligeiros	43654	43202	40745 <sup>(b)</sup>
Feridos Graves	3116	3483	2479 <sup>(b)</sup>
Mortos	854	850	728 <sup>(b)</sup>

Na maior parte das situações, os acidentes ocorrem por falha humana, sendo a causa mais comum a condução sob influência de álcool. Cada vez mais se questiona até que ponto as drogas de abuso e medicamentos podem também estar relacionados com os acidentes de viação e o que pode ser efectuado para contrariar estes resultados (EMCDDA, 1999; Europe, 1999; Transport, 2002).

A Lei nº18/2007 de 17 de Maio, que regulamenta a fiscalização da condução sob a influência do álcool ou de substâncias psicotrópicas, considera, no seu artigo 8º do Capítulo II como substâncias psicotrópicas a analisar, os canabinóides, os opiáceos, cocaína e metabolitos, anfetaminas e derivados. Este artigo refere, igualmente que “pode ainda ser pesquisada a presença no sangue de qualquer outra substância psicotrópica que tenha influência na capacidade de condução”, englobando-se aqui a possibilidade de determinação de medicamentos, sob ordem judicial.

Efectivamente, a avaliação da utilização destas substâncias pelos condutores é de elevada importância já que o consumo diário atinge proporções muito relevantes, tal como se pode observar na Tabela 7.

**Tabela 7** – Número de embalagens de psicofármacos cedidas no período 2005 a 2007, sua posição em relação a todos os outros grupos farmacoterapêuticos no mercado e o psicotrópico mais prescrito e sua posição na listagem de medicamentos mais prescritos. (*Fonte* – Infarmed)

	2005	2006	2007
Nº de embalagens	19 588 584	19 820 178	18 329 481
Posição na lista de subgrupos farmacoterapêuticos mais prescritos	1º	1º	2º
Psicotrópico mais prescrito (posição na lista de medicamentos mais prescritos)	Xanax (4º)	Xanax (4º)	Lorenin (3º)

Em Portugal, de acordo com o artigo 81º do novo Código da Estrada, aprovado pelo Decreto de Lei nº 44/2005, de 23 de Fevereiro, é proibido conduzir sob a influência de álcool ou de substâncias psicotrópicas e, segundo o artigo 152º, devem ser submetidos às provas estabelecidas para a detecção do estado de influenciado pelo álcool ou por substâncias psicotrópicas, todos os condutores ou peões envolvidos em acidentes de trânsito, assim como os que se proponham a iniciar a condução.

O apelo à imoralidade da condução sob influência de álcool ou de substâncias psicotrópicas e as campanhas de apelo desenvolvidas têm demonstrado resultados insuficientes. Os condutores estão conscientes do erro que cometem mas continuam a quebrar as regras, já que o sentimento de impunidade é muito grande. Deviam ser desenvolvidos programas de tratamento e de reeducação em especial nos condutores reincidentes (Carvalho, 2007).

Uma vez que as substâncias psicotrópicas têm como alvo principal da sua acção o sistema nervoso central, é de assumir a sua influência sobre a capacidade de condução, podendo ser potenciada pelo consumo de álcool, mesmo quando não atinge valores ilegais.

Apesar de não existirem muitos estudos sobre esta matéria, estima-se que cerca de 10% dos condutores que morrem em acidentes de viação utilizam medicação psicotrópica, o que se pode considerar um factor de grande relevo (Gier, 1999).

As drogas de abuso e os medicamentos, embora não tenham o mesmo enquadramento legal, podem desencadear problemas semelhantes no que diz respeito à capacidade de conduzir. Está comprovado que o risco de acidente aumenta quando se está sob a influência de drogas ou de determinados medicamentos, podendo ainda

a situação ser agravada com o consumo concomitante de álcool. Ao contrário do que acontece com o álcool, a maior parte das drogas de abuso e medicamentos não apresentam uma resposta linear entre a concentração plasmática e a diminuição das capacidades motoras e conseqüente aumento risco de acidentes (Panel, 1985).

A diminuição da atenção, da concentração, dos seus reflexos, da capacidade visual e raciocínio, e da coordenação motora, aliados ao aumento dos tempos de reacção e agravado pelo facto das pessoas não se consciencializarem de que têm as suas capacidades diminuídas, torna os medicamentos num risco para a segurança rodoviária, inclusivamente medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM). Devem ser tomados apenas os medicamentos prescritos recentemente pelo médico, respeitando a posologia por ele indicada e esperar sempre pela adaptação do organismo à medicação antes de voltar a conduzir. São de referir, também, os perigos adjacentes à condução de doentes crónicos que não respeitam a medicação, colocando assim em risco a sua vida e a de terceiros ([www.dgsaude.pt](http://www.dgsaude.pt)).

É de salientar que, ao contrário das drogas de abuso, os medicamentos são produtos introduzidos no mercado após a autorização de órgãos competentes, são prescritos por médicos e cedidos por farmacêuticos.

Logo, a sua utilização deve ser feita com cuidados que são transmitidos por todas estas entidades e de acordo com as instruções específicas transmitidas pelos elementos desta cadeia.

A grande maioria dos medicamentos deve fazer referência, no resumo das características do medicamento (RCM), à possibilidade de interferência nas capacidades de condução. Em França, por exemplo, nas embalagens de medicamentos mais cuja influência está comprovada, encontra-se inscrito um símbolo alertando para a possível influência sobre a condução (Álvarez, 2002).

A influência de medicamentos e drogas de abuso na condução deve ser avaliada recorrendo a simuladores, testes de vigilância e performance, testes psicomotores, testes de reacção, bem como a estudos na estrada (O'Hanlon, 1986). Estudos deste género já revelaram o aumento do risco de acidentes em condutores que consomem benzodiazepinas e antidepressivos tricíclicos (Barbone, 1998; Neutel, 1998).

Relativamente a medicamentos que no seu RCM advertem para a sua possível acção perniciosa sobre a condução, deve haver especial cuidado na sua utilização, já que um estudo detectou um considerável aumento do risco em condutores que

tomam estes medicamentos, sendo responsáveis por 3,6-7,2% de acidentes que provocaram vítimas mortais e 2,6-5,2% de acidentes envolvendo feridos (Hering, 1994).

Nem todos os medicamentos que indicam que podem afectar a condução o fazem do mesmo modo ou com a mesma intensidade. Existe uma proposta do International Council on Alcohol Drugs & Traffic Safety (ICADTS) dizendo que no RCM deve aparecer a classificação do produto quanto à sua capacidade de inabilitação comparando-a com a da concentração de álcool no sangue, referindo se a sua acção é inexistente ou negligenciável quando é equivalente a um teor de álcool no sangue (TAS) <0,2g/l, média ou moderada quando a TAS se encontra entre 0,2 e 0,5g/l, ou se é elevada quando é equivalente a uma TAS de 0,5g/l. No entanto, ainda não está disponível qualquer legislação sobre o modo como este grau de incapacidade deve ou pode ser avaliado (Álvarez, 2001).

A detecção de substâncias ilícitas pode ser efectuada, não só após o consumo, mas também durante longos períodos que podem ultrapassar as 24 horas, ainda que a concentração máxima da maioria destas substâncias seja atingida, tal como no caso do álcool, no intervalo de meia hora a 2 horas (quando administradas por via oral; quando por via nasal, injectável ou fumada o pico de  $C_{máx}$  é imediato) (Carvalho, 2007).

As diferentes respostas inter-individuais devem-se a diferentes mecanismos farmacodinâmicos e farmacocinéticos dependentes das características fisiológicas dos consumidores. Podem também ocorrer diferentes respostas intra-individuais que variam de acordo com factores como a idade, o índice de massa corporal (IMC), estado de saúde, dose consumida ou uso concomitante com outras substâncias. No caso dos canabinóides, por exemplo, após uma toma única, a eliminação só se considera completa ao fim de 30 dias (Carvalho, 2007).

Tendo a maioria dos medicamentos e das drogas de abuso uma marcada lipofilia, de modo a que mais facilmente possam ultrapassar as barreiras biológicas (particularmente neste caso, a barreira hematoencefálica), acabam por ficar alguns vestígios acumulados no tecido adiposo.

A libertação destes tecidos ocorre normalmente de uma forma lenta e gradual, mas em determinados casos esta libertação pode ser mais rápida (exercício físico

intenso e dietas rigorosas, em que o organismo utiliza a gordura como fonte de energia).

Nestes casos, ocorre uma redistribuição para o cérebro e são assim alcançados níveis detectáveis destas substâncias nos fluidos biológicos, mesmo após longos períodos de tempo (Carvalho, 2007).

Até que ponto estas concentrações residuais terão implicações na capacidade de condução é ainda uma incógnita.

A acção destas substâncias está dependente da dose, do grau de tolerância (consumidores habituais) e do estado de fadiga e de saúde.

Apesar de ser sempre difícil estabelecer uma relação de causa-efeito entre a detecção de uma substância e um acidente, é sempre de considerar o aumento significativo do risco inerente ao seu consumo. Um consumidor habitual de drogas de abuso poderá continuar com uma condução perigosa mesmo em períodos de não consumo.

Possivelmente com a ilegalização do seu consumo seriam atingidos níveis mais baixos de mortalidade e de morbilidade (Carvalho, 2007).

## **2 – A INFLUÊNCIA DO TRAMADOL NA CONDUÇÃO**

A utilização de opióides durante longos períodos de tempo na terapêutica da dor tem sofrido um considerável aumento em muitos países europeus. A principal intenção com o uso deste tipo de medicamentos é de, não só obter o alívio da dor e diminuição dos seus sintomas, mas também providenciar um considerável aumento da qualidade de vida dos doentes, permitindo que possam readquirir um papel social activo bem como voltar a ocupar o seu posto de trabalho.

O tramadol é um dos analgésicos preferidos pelos clínicos em caso de dor ligeira a moderada. Em Portugal, todas as formas farmacêuticas que na sua composição contêm tramadol só podem ser adquiridas mediante a apresentação de uma prescrição médica válida.

Tal como referido anteriormente, a condução, hoje em dia, faz parte de um conjunto de tarefas diárias que, pela possibilidade de conferir autonomia e independência, tem uma grande relevância no que diz respeito à valorização da

qualidade de vida de cada pessoa. Assim, é cada vez mais premente aferir a influência de tratamentos prolongados com opióides na condução (Kress e Kraft, 2004).

Após a administração de uma dose única de um opióide em indivíduos que nunca tenham consumido este tipo de fármacos desencadeiam, geralmente, uma série de efeitos secundários, tais como sedação, tonturas acompanhadas de vômitos e mesmo alguma confusão mental. Quando Hill e Zancy (2000) avaliaram esta situação através de testes psicomotores e cognitivos, revelaram que estes indivíduos demonstravam um aumento no tempo de reacção e que a sua coordenação motora, a sua capacidade de atenção e a sua memória instantânea ficavam significativamente afectadas. Podemos, assim, considerar que doentes que estejam a utilizar este tipo de fármacos pela primeira vez estão sujeitos a alterações psicomotoras e cognitivas suficientemente graves que podem interferir com a sua capacidade de condução.

A administração crónica de opióides provoca uma diminuição gradual da intensidade dos seus efeitos secundários, nomeadamente no que diz respeito ao seu efeito sedativo (Dellemijn e col., 1998). No entanto, em muitos países, a condução após o consumo de medicamentos opióides é estritamente proibida, quer o condutor esteja afectado ou não pelos efeitos secundários destes fármacos. Apenas na Áustria é efectuada uma avaliação subjectiva ou objectiva da capacidade de condução após a detecção do consumo destes medicamentos, para que seja considerada como violação do código da estrada. Na maior parte dos países europeus não é feita qualquer distinção entre consumo agudo ou crónico destes medicamentos, bem como entre o consumo por prescrição médica ou por acto ilícito, apenas em França e na Alemanha é tida em consideração essa distinção (Kress e Kraft, 2004).

No entanto, diversos estudos (Vainio e col., 1995; Lorenz e col., 1997; Strumpf e col., 1997; Larsen e col., 1999; Galski e col., 2000; Sabatowski e col., 2003) consideraram que doentes sob tratamento crónico com opióides não sofrem de alterações psicomotoras e/ou cognitivas suficientemente graves para que possam interferir com a sua capacidade de conduzir.

Há, no entanto, regras que devem ser tidas em consideração quando se prescreve ou se utiliza um fármaco opióide. Conduzir ou decidir se vai conduzir sob utilização de medicamentos opióides é sempre uma decisão individual e pessoal que deve ser avaliada e considerada diariamente vezes sem conta, devendo o médico

incutir no seu doente a responsabilidade do acto que está a executar. O consumo concomitante de outra medicação com efeitos psicoactivos e de álcool é considerado incompatível para uma condução segura. O doente deve ser informado convenientemente pelo seu médico de todos os riscos inerentes ao seu tratamento e entre ambos deve ser estabelecida uma comunicação constante sobre as suas capacidades físicas e mentais.

O médico deve avaliar constantemente o efeito da terapêutica implementada e apenas o médico prescriptor ou a sua instituição (por ter acesso ao processo do doente) podem fazer esta avaliação (Kress e Kraft, 2004).

Tal como outros depressores do sistema nervoso central, os opióides podem diminuir a capacidade psicomotora ou outras funções relevantes para a prática de uma condução segura. Alguns estudos indicam que o tramadol, especialmente em doses elevadas, pode comprometer as capacidades de condução de um indivíduo (Baselt, 2001). A molécula de tramadol em si, devido à sua fraca capacidade de ligação aos receptores opióides, terá uma acção relativamente diminuída no que diz respeito à capacidade de condução. O mesmo não se passa com o seu principal metabolito que apresenta características opióides semelhantes às da codeína.

O consumo de tramadol, apesar de não demonstrar um aumento significativo no risco de acidente de viação, demonstra uma tendência clara de aumento da probabilidade de esse acidente ocorrer, quando comparado com risco base (Bachs e col., 2009). A prescrição concomitante de benzodiazepinas com analgésicos opióides fracos é frequente, devido à sua acção miorelaxante, ocorrendo assim um aumento exponencial dos perigos para uma condução segura (Bachs e col., 2008), o mesmo se passa com o consumo concomitante com álcool.

### **3 – A INFLUÊNCIA DA AMITRIPTILINA NA CONDUÇÃO**

A maior parte dos antidepressivos apresenta uma eficácia terapêutica semelhante, pertençam ao grupo dos Inibidores Selectivos da Recaptação de Serotonina (ISRS) ou aos Antidepressivos Tricíclicos (ATC) (Anderson, 2000), como a amitriptilina. Assim, a escolha do antidepressivo é determinada, em grande parte, pelos efeitos secundários e pelo perfil de tolerância do indivíduo em causa.

Para atingir os resultados pretendidos no tratamento de depressões, evitando recaídas, e para que haja uma melhoria na vida social e ocupacional dos doentes, é necessária uma boa adesão à terapêutica implementada durante períodos de tempo geralmente longos (Geddes, 2003). Os efeitos secundários resultantes deste uso prolongado são muitas vezes razão suficiente para que os doentes interrompam os tratamentos e podem também incapacitá-los para algumas actividades diárias, incluindo a condução (Nemeroff, 2003).

Alguns estudos referem que consumidores de ATC têm o dobro da probabilidade de estar envolvidos em acidentes de viação quando comparados com não consumidores (Ray, 1992; Leveille, 1994). No entanto, ainda não está esclarecida a relação causal entre antidepressivos e acidentes de viação.

A condução é uma actividade complexa que requer muitos processos cognitivos, tais como percepção, atenção, aprendizagem, memória, capacidade de decisão e controlo da acção. Assim, a avaliação do efeito dos antidepressivos na condução deve ser efectuada não só em termos de performance de condução mas também da função cognitiva.

Os estudos mais recentes têm utilizado como métodos de avaliação da função cognitiva o “Wisconsin Card Sorting Test” (WCST), o “Continuous Performance Test” (CPT) e o “N-back Test”, já que implicam o recurso ao córtex frontal que é a zona cerebral mais utilizada durante a condução, e também simuladores que permitem testar diversas situações de condução (Iwamoto, 2008). Estes estudos demonstraram que em indivíduos saudáveis a quem foram administradas doses únicas de 25 mg de amitriptilina houve uma alteração considerável das capacidades de condução e das capacidades cognitivas (CPT) 4h após a toma (comparação com paroxetina e placebo) (Iwamoto, 2008). Estudos anteriores demonstraram que a sonolência é a causa mais importante de incapacidade de condução em indivíduos em tratamento com antidepressivos (Ramaekers, 2003). Ao contrário dos ISRS a amitriptilina tem grande afinidade para os receptores colinérgicos, adrenérgicos ( $\alpha 1$ ) e histamínicos (H1), resultando daí um défice cognitivo, perturbações no equilíbrio e sedação, respectivamente (Hindmarch, 1983).

Todas estas características tornam o consumo de amitriptilina num factor de risco adicional para a condução rodoviária.

# Parte I

## *Capítulo IV*

*Determinação de Tramadol e  
Amitriptilina em Amostras  
Biológicas*



## 1 – INTRODUÇÃO

A exposição e distribuição dos medicamentos no Homem ocorre mediante múltiplos condicionalismos, nomeadamente na sequência da via de administração, distribuição pelo organismo e conseqüente passagem através dos fluidos orgânicos. Assim sendo, a informação sobre o consumo de medicamentos pode ser obtida a partir da análise químico-toxicológica das respectivas amostras biológicas, constituindo a escolha da amostra a analisar um passo crítico, uma vez que cada matriz envolverá as suas características específicas, quer bioquímicas e farmacodinâmicas quer farmacocinéticas (Huestis e Cone, 1998).

Actualmente, são várias as amostras biológicas utilizadas, quer em toxicologia clínica quer em toxicologia forense, com o objectivo de detectar e quantificar substâncias exógenas, desde substâncias tóxicas a medicamentos (Magerl e Schulz). As matrizes mais utilizadas para a detecção deste tipo de substâncias são a saliva, o sangue, a urina, o suor e o cabelo (Verstraete, 2004; Skopp e col., 2007; Huestis e col., 2008), sendo certo que todas elas apresentarão as sua vantagens e desvantagens.

Para que se torne útil a determinação de substâncias em matrizes alternativas, será importante que se conheçam os princípios químicos e farmacológicos fundamentais, responsáveis pelo aparecimento e desaparecimento das substâncias e seus metabolitos nestas matrizes, uma vez que a disposição dos medicamentos estará aí dependente de variados factores. Entre esses, desde logo, as propriedades físico-químicas do agente em causa. Segue-se posteriormente, a via de administração, a dose e a posologia, o tipo de distribuição (plasmática, tecidual, celular), os processos de biotransformação ou metabólicos e os processos de eliminação. Isto corresponde à respectiva farmacocinética ou toxicocinética do produto (Drummer, 2005).

A determinação e quantificação de uma ou mais substâncias nas diferentes amostras biológicas, dando indicação de diferentes janelas de detecção, permite obter uma perspectiva conjunta sobre toda a envolvente do consumo de um determinado medicamento. Assim, a determinação não apenas da concentração do medicamento, mas também da conjugação com as respectivas  $C_{máx}$ , AUC e  $t_{1/2}$  a vários níveis, poderão vir a ser uma mais valia para responder a questões muitas vezes difíceis de solucionar com a análise de uma única amostra biológica (Drummer, 2005).

Em relação ao tramadol e à amitriptilina, são alguns os métodos desenvolvidos e discutidos para a sua detecção e determinação. Todavia, são os imunoensaios a metodologia geralmente mais utilizada para a realização de testes de triagem avaliadores da utilização destes medicamentos.

No entanto, para a fiscalização da condução sob influência de substâncias psicotrópicas, bem como na generalidade dos casos forenses, é necessária, ou mesmo obrigatória, a posterior confirmação dos resultados positivos obtidos (Weimmann e col., 2001). Tal confirmação é usualmente realizada recorrendo-se a técnicas como a cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa (GC-MS). Esta metodologia, apesar de amplamente utilizada, é dispendiosa e muito laboriosa, uma vez que requer uma preparação exaustiva da amostra biológica, bem como a sua derivatização (Marin e col., 2007; Thomas e col., 2007).

Por isso, algumas técnicas de cromatografia líquida de alta resolução acoplada à espectrometria de massa (LC-MS), foram introduzidas em toxicologia forense, procurando-se, assim, ultrapassar algumas daquelas limitações, bem como alcançar cada vez mais baixos limites de detecção. Na verdade, a LC-MS tem demonstrado ser uma alternativa ideal à GC-MS, especialmente para a detecção e quantificação de moléculas mais polares, termolábeis ou com concentrações muito reduzidas, constituindo um modelo de eleição em toxicologia clínica e forense. Assim, pode dizer-se que existe um esquema analítico para a determinação de amitriptilina e tramadol, que passa por uma prévia triagem, seguida de uma confirmação dos resultados positivos. Este esquema está adaptado de acordo com as substâncias a analisar bem como com a amostra biológica.

## 2 – SALIVA

A saliva é um fluido aquoso, transparente, segregado na cavidade oral a partir de três glândulas principais: (1) a glândula parótida, que segrega saliva derivada principalmente do plasma sanguíneo (fluido seroso); (2) as glândulas sublinguais, que segregam fluido seroso e mucina; (3) as glândulas submandibulares, que também segregam fluido seroso e mucina (Kidwell e col., 1998).

As células serosas segregam um fluido aquoso, transparente, com um elevado conteúdo electrolítico e as células mucosas são responsáveis pelo aspecto mais viscoso da saliva, uma vez que o fluido que segregam é constituído pelas amilases, mucoproteínas e mucopolissacarídeos.

A maior parte dos estudos realizados em humanos envolve a saliva total, sendo muitas vezes adoptado o termo fluido oral para descrever a amostra colhida da cavidade oral. Assim sendo, este fluido oral será constituído não só pelas secreções das glândulas submandibulares (71%), parótida (25%) e sublinguais (4%), mas também pelas secreções de outras glândulas (labial, bucal e palatal), bem como das células do epitélio, fluido gengival e microorganismos orais (Ritschel e Tompson, 1983; Hold e col., 1995). A concentração das substâncias provenientes de cada secreção e as contribuições relativas das variadas glândulas no fluido final podem variar consideravelmente (Siegel, 1993). A estimulação neuronal e hormonal controla o fluxo de saliva, que pode variar entre 0 a 10 ml/min para um total diário de 500 a 1500 ml.

O pH da saliva não estimulada é ligeiramente ácido, entre 5,6 e 7,0, mas aumenta com o fluxo (estimulação), para um pH mais próximo do do sangue (7,4) até um máximo de 8,0 (Kidwell e col., 1998). A composição da saliva também varia com o fluxo, sendo cerca de 90% de água e 10% de electrólitos, amilase, glucose, ureia, lípidos, proteínas e hormonas.

A produção de saliva é totalmente regulada através de estímulos neurológicos, via acção reflexa. A produção deve-se, essencialmente, à estimulação mastigatória e gustativa, envolvendo a estimulação simpática e parassimpática das glândulas, (Garrett, 1987) principalmente através dos receptores  $M_3$ -muscarínicos e  $\beta_2$ -adrenérgicos respectivamente.

Muitos factores são responsáveis pela alteração do fluxo e da composição salivar, tais como o grau de hidratação (Dawes, 1987), o tipo de dieta e o ritmo circadiano, importantes particularmente no que se refere ao fluxo de saliva (Dawes, 1972).

Os medicamentos podem ser incorporados na saliva a partir do sangue através de um mecanismo de difusão passiva, ultrafiltração e/ou transporte activo. De todos estes processos, a difusão passiva, de acordo com um gradiente de concentrações representa a via mais importante para a maior parte das substâncias. Note-se, no entanto, que para que ocorra difusão passiva através das membranas lipídicas, as moléculas têm que se encontrar na sua forma lipossolúvel (Paxton, 1979). A passagem através da membrana celular é limitada para moléculas cujo peso molecular é superior a 500 e a correspondente entrada é também restrita para moléculas ionizadas (hidrossolúveis) ou ligadas às proteínas plasmáticas. Por outro lado, o pH da saliva e do plasma e o pKa da substância e o seu grau de ligação às proteínas controla a relação saliva/plasma (S/P) das substâncias ionizáveis. Note-se que o fluxo salivar tem uma elevada influência no pH da saliva, e conseqüentemente, nas razões S/P (Wood e col., 1982).

Se o pKa da substância é maior que 8,5 (para moléculas básicas), menor do que 5,5 (para moléculas ácidas) ou se a substância não é ionizável, o pH da saliva terá pouca influência na concentração (Kidwell e col., 1998). As concentrações de medicamentos básicos em saliva (tal como a amitriptilina e o tramadol) são semelhantes ou mesmo superiores às do sangue (Dummer, 2006).

Geralmente, pode ser estabelecida uma correlação entre a concentração do medicamento livre em sangue e a sua concentração em saliva. Sabe-se que o plasma contém quer a molécula livre quer a molécula ligada a proteínas, sendo a sua forma livre a que pode ser considerada farmacologicamente activa (a que chega ao local de acção, a que pode ser metabolizada, a que pode ser eliminada) (Brodie, 1967). A partir do momento em que esta fracção livre é excretada pelas glândulas salivares, atinge-se um equilíbrio saliva-plasma, sendo de admitir que as concentrações das substâncias no fluido oral podem reflectir as respectivas concentrações plasmáticas (Davies, 1943; Koysooko e col., 1974; Troupin e Friel, 1975; Ritschel e Tompson, 1983). Assim sendo, em condições clínicas nas quais a ligação às proteínas pode

variar, a concentração em saliva estará mais intimamente relacionada com a concentração farmacologicamente activa da substância do que com a concentração plasmática total. Tal dependerá da capacidade de cada molécula se ligar às proteínas plasmáticas (em regra conhecida), mas poderá ser influenciada por outros factores (interacções medicamentosas em que ocorre uma competição entre diferentes fármacos pela ligação às proteínas; diminuição da concentração de proteínas plasmáticas, como nos idosos) que condicionem uma maior percentagem de medicamento livre e, conseqüentemente, biologicamente activo.

Também por isto, a concentração de um medicamento na saliva poderá reflectir melhor a concentração da sua forma livre e, conseqüentemente, traduzir melhor a quantidade de fármaco biologicamente activo em determinado momento.

Apesar da saliva apresentar um baixo teor proteico comparativamente com o sangue, Idowu e Caddy (1982) observaram que uma possível causa de erro nas determinações em saliva pode ser resultante da ligação às mucoproteínas salivares, quando se subestimam as concentrações determinadas após centrifugação. Assim, frequentemente a fracção ligada às mucoproteínas pode ser precipitada por centrifugação durante o processamento da amostra.

As amostras de saliva podem ser colhidas pelo simples processo directo para um tubo (cuspir directamente para o tubo), apesar de, em tal método se obterem usualmente quantidades mais limitadas. Maiores quantidades poderão ser obtidas através da estimulação da produção de saliva, com a mastigação de bandas de borracha, pastilha elástica ou rebuçados, com adição de umas gotas de ácido cítrico na língua ou com a introdução de um algodão na boca deixando o tempo suficiente para que fique impregnado. No entanto, a selecção do material de estimulação de saliva tem de ser criteriosamente escolhido, tendo em conta que as substâncias lipofílicas podem ser adsorvidas pelo material (Kidwell e col., 1998). Esta estimulação artificial irá provocar alterações ao nível do pH e, conseqüentemente, nas concentrações das substâncias em análise. O'Neal e Crouch (2000) demonstraram que estas alterações de pH podiam provocar uma diminuição nas concentrações de codeína de duas a seis vezes, enquanto Schepers e col., em 2003, detectaram alterações semelhantes no estudo de metanfetaminas, já Kato (1993) obteve os mesmos resultados na sua pesquisa de cocaína. Assim, podemos inferir que alterações semelhantes ocorram na pesquisa de outras moléculas.

Consequentemente, existe uma grande intra- e intervariabilidade, no que diz respeito à concentração de substâncias na saliva, dependendo da técnica de recolha utilizada, além da influência de factores inerentes à substância a analisar que podem provocar alterações à sua concentração.

Já as diferenças interindividuais normalmente verificadas são devidas, para além da absorção, a diferenças na distribuição no organismo, no metabolismo e na excreção dos compostos. Factores como a idade, índice de massa corporal, sexo, estado de saúde, dose consumida e consumo concomitante de outras substâncias, farão variar os níveis de drogas e medicamentos de indivíduo para indivíduo, explicando também variações encontradas para o mesmo indivíduo em alturas diferentes.

Na maior parte dos casos, a concentração na saliva pode ser estimada, tendo por base os valores de pH da saliva e do sangue, bem como a percentagem de ligação da substância às proteínas plasmáticas e o seu pKa (United Nations , 1998; Crouch, 2005). Para substâncias ácidas o equilíbrio favorece a sua presença no sangue, enquanto que para substâncias básicas ocorrem concentrações superiores em saliva. Na fase de absorção, as concentrações no fluido oral são superiores devido à absorção local através das mucosas da cavidade bucal (Magerl e Schulz).

Todos estes dados demonstram que a farmacocinética de qualquer substância na saliva é mais complexa do que no sangue. Os tempos de detecção nesta matriz vão depender de diversos factores, incluindo a dose, a frequência de utilização (aguda ou crónica) e dos próprios limites de detecção do método analítico envolvido.

O interesse pela utilização da saliva como matriz biológica tem aumentado, significativamente, com o decorrer dos anos, uma vez que esta amostra apresenta propriedades particularmente interessantes.

Em primeiro lugar, uma das grandes vantagens da utilização de saliva é o facto de ser facilmente acessível, sendo, assim, pouco invasiva a sua recolha e não necessitando de pessoal médico especializado.

Por outro lado, outra grande vantagem da utilização desta matriz biológica prende-se com o facto de que se obtêm melhores resultados de correlação entre os casos positivos para drogas em saliva e consequente estado de influenciado do que os casos positivos em urina (apesar de apresentar menores tempos de detecção do que a

urina), bem como a correlação entre as concentrações detectadas em saliva e as detectadas no sangue na sua forma livre (Gross e col., 1978).

A maior parte das substâncias na sua forma livre desaparece da saliva e do sangue cerca de 12 a 24 horas após a sua administração. Existe, por isso, uma relação temporal entre o desaparecimento das substâncias da saliva e a duração dos seus efeitos. Consequentemente, a saliva poderá constituir uma amostra biológica muito útil para a detecção do consumo recente de substâncias em condutores, vítimas de acidentes e no âmbito do controlo laboral, uma vez que existe uma estreita correlação com o estado de influenciado (Wlash e col., 2004). Também a partir dos dados obtidos no projecto Europeu ROSITA se concluiu que, para a maioria das drogas de abuso, a correlação de concentrações no sangue é melhor com a saliva do que com a urina. Comprovou-se, mesmo, que existe uma boa correlação entre a presença ou ausência de drogas em saliva e em sangue (Kuaert e col., 2002; Verstraete, 2005), esperando-se obter tempos de detecção mais semelhantes entre a saliva e o sangue do que entre o sangue e a urina (Verstraete, 2004). No entanto, será óbvio que nunca existirá uma correlação de 100% entre os diferentes fluidos biológicos, uma vez que os resultados sofrem a influência do tempo que decorre entre a administração e a colheita da amostra (Verstraete, 2005). Se uma substância foi administrada muito recentemente, é possível que apenas seja detectada em sangue e saliva, mas não na urina. O contrário poderá também ocorrer, a presença apenas em urina e não em sangue e saliva, quando o consumo não é recente.

Além de poder ser utilizada como alternativa ao sangue, a saliva pode também ser utilizada como alternativa à urina, em especial nos casos em que se suspeita de substituição ou adulteração (O'Neal e col., 2000). A saliva tem sido utilizada como meio de diagnóstico (Choo e col., 2004), em despiste de consumo de substâncias ilícitas no local de trabalho (Caplan e col., 2004), na estrada (Kadehjian e col., 2005), em estabelecimentos prisionais e noutras instituições correcionais e também na avaliação do estado de influenciado de indivíduos após a prática de um crime. A avaliação de tempos de detecção (Verstraete, 2004) e de farmacocinética de algumas drogas (Drummer, 2005) tem também suscitado algum interesse científico.

Esta amostra biológica terá igualmente a vantagem de estar menos exposta a interferências causadas pelo metabolismo, comparativamente com o sangue ou urina (Kintz e col., 2004), e da existência do composto activo nesta amostra (Walsh e col.,

1999) estar sempre em maiores concentrações comparativamente com os respectivos metabolitos.

No entanto, apesar de todos os atributos que lhe são reconhecidos, não se pode considerar a saliva como um substituto do sangue ou da urina na detecção de drogas. Cada matriz tem as suas vantagens e desvantagens (Drummer, 2006).

A colheita de amostra torna-se, muitas vezes, desconfortável para o indivíduo, em especial em situações de síndrome da boca seca (ansiedade da recolha, má hidratação ou mesmo uso de canabinóides), levando algum tempo até que se obtenha o volume de amostra adequado, para além de que, em muitos casos, a amostra pode ser muito viscosa, necessitando de um tratamento laboratorial prévio (Teixeira e col. 2005; Verstraete, 2005).

Mesmo com recurso a técnicas de estimulação, o volume de amostra obtido pode ser muito reduzido, sendo insuficiente para a análise pretendida (Verstraete, 2005).

Note-se, inclusivamente, que pode ocorrer contaminação directa da cavidade oral e, conseqüentemente, da saliva, aquando das administrações por via oral (medicamentos orodispersíveis) e inalatória (incluído fumar), alcançando-se temporariamente concentrações extremamente elevadas que nada têm a ver com as relações S/P (Verstraete, 2005).

Outra possível desvantagem poderá ser o curto período de tempo de detecção das substâncias em saliva (12-24 horas após o consumo), não validando a utilização desta amostra para avaliar um consumo anterior. Contudo, este mesmo facto leva à primordial vantagem desta amostra como processo de detecção/determinação de um consumo recente (Cone, 1993).

## **2.1 - Influência da Amitriptilina e do Tramadol na produção de saliva**

A saliva é de vital importância para a protecção dentária e para evitar doenças orais (Mandel, 1987) e a falta da mesma pode levar à xerostomia, com resultados terríveis no que diz respeito à saúde oral do indivíduo envolvido. Esta situação pode ser potenciada em indivíduos sujeitos a tratamentos crónicos com medicamentos que provoquem a diminuição ou mesmo supressão da produção de saliva.

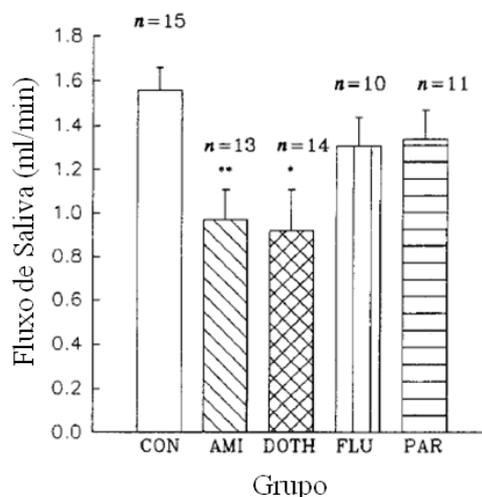
Há inúmeras causas para a diminuição da produção de saliva (Skopouli ecol., 1989), entre as quais estão a radiação e depressão (Brown, 1970), diabetes (Sreebny e col., 1989). No entanto, a causa mais frequente para esta situação é a utilização de medicamentos (Schubert e Izutsu, 1987; Sreebny e Valadini, 1988), tais como diuréticos, anticonvulsivantes, neurolépticos e alguns broncodilatadores e antidepressivos (Roth e Calmes, 1981).

### *Amitriptilina*

A incidência da diminuição de produção de saliva entre indivíduos em tratamento com antidepressivos (tricíclicos ou inibidores da MAO) é de cerca de 40 a 59% (Sreebny e col., 1989; Dechant e Clissold, 1991), situação esta que pode ocorrer por bloqueio reversível dos receptores muscarínicos (Schubert e Izutsu, 1987).

Na verdade a amitriptilina é mesmo considerada o antidepressivo que provoca um efeito mais pronunciado na diminuição de produção de saliva, já que possui uma grande afinidade para estes receptores (Tollefson e Senogles, 1983). Este efeito prolonga-se no tempo durante um tratamento crónico (Bertram e col., 1979), sendo considerado um dos factores mais importantes para a interrupção da terapêutica por parte dos doentes (Clemmesen, 1988).

Mesmo com a nova geração de antidepressivos (inibidores selectivo da recaptção da serotonina) sem aparente acção anti-muscarínica, 5 a 15% dos doentes continuaram a referir “boca seca” como sendo um dos principais efeitos secundários (Tacke, 1989; Thomas e col., 1987).



**Figura 10** – Comparação do fluxo salivar em grupos de indivíduos em tratamento com placebo (CON), amitriptilina (AMI), dotiepinga (DOTH), fluoxetina (FLU) e paroxetina (PAR). (Adaptado de: Hunter e Wilson, 1995).

Num estudo efectuado por Hunter e Wilson (1995), para avaliar o efeito de antidepressivos na saliva e no seu conteúdo, ficou comprovada uma diminuição marcada do fluxo de saliva em indivíduos que utilizam amitriptilina, quando comparado com indivíduos do grupo controlo ou que utilizam outros antidepressivos (Fig. 10). A amitriptilina, graças à sua afinidade para os receptores muscarínicos das glândulas salivares, actua como inibidor competitivo da acetilcolina libertada pelos nervos parassimpáticos junto das células acinares (Shein e Smith, 1978).

A diminuição do fluxo de saliva nos doentes em tratamento com antidepressivos tricíclicos foi de, aproximadamente, 60%, com possíveis consequências sérias para a sua saúde oral. Já para os inibidores selectivos de recaptção de serotonina, este estudo revelou resultados um pouco mais elevados quando comparados com outros (Tacke, 1989; Dechant e Clissold, 1991), no que se refere aos doentes que se queixam deste efeito secundário (35%).

Assim, a recolha de saliva em condutores que estejam sob a influência deste antidepressivo pode, de algum modo, tornar-se mais demorada.

### ***Tramadol***

Apesar de todos os efeitos secundários verificados por doentes que utilizam tramadol (náuseas, tonturas, sudação, vómitos e boca seca), este medicamento é, ainda assim, bem tolerado (Lee e col., 1993).

A secreção de saliva é maioritariamente dependente de mecanismos mediados por impulsos nervosos e parassimpáticos, activando os receptores muscarínicos glandulares (Garret, 1987). As moléculas xerogénicas exercem a sua capacidade inibindo a transmissão de impulsos nervosos centralmente ou através do sistema nervoso periférico, bloqueando os receptores muscarínicos e adrenérgicos glandulares (Sreebny, 1997; Sreebny e Schwartz, 1997).

Num estudo recente, o tramadol demonstrou uma grande capacidade de induzir hipossalivação em 75% dos indivíduos participantes (Gotrick e col., 2004), mesmo quando utilizado em doses consideradas terapêuticas para o tratamento da dor (50mg bds). No entanto, o mecanismo através do qual provoca esta situação ainda não está completamente esclarecido.

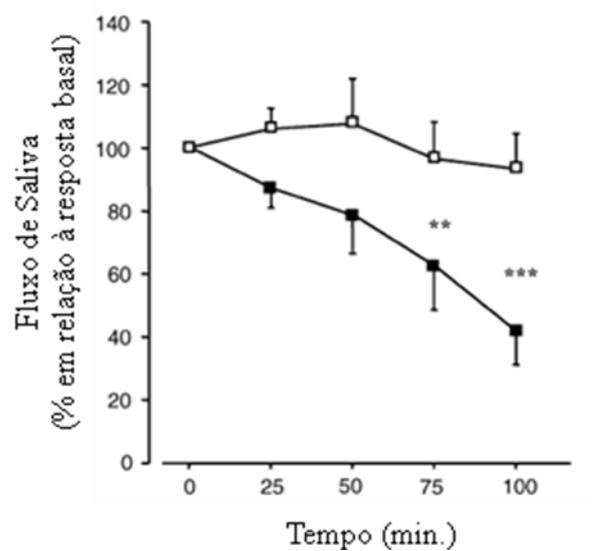
Uma vez que os receptores muscarínicos são um dos principais alvos de moléculas analgésicas e o tramadol demonstrou capacidade inibitória para os receptores M<sub>3</sub>-muscarínicos (Shiga e col., 2002), esta molécula pode ser responsável pelo antagonismo ao nível dos receptores muscarínicos das glândulas salivares. No entanto, uma vez que o tramadol exerce também efeitos inibitórios ao nível do sistema nervoso central, tem sido considerada a hipótese de ser através deste mecanismo que exerça a xerostomia.

Para avaliar esta possibilidade, Gotrick e Tobin (2004) estudaram o potencial xerogénico e o mecanismo de acção da inibição da secreção salivar provocada pelo tramadol, em ratos. No grupo controlo [(□), n=7], o período de aplicação de 10 minutos foi repetido cinco vezes a cada 15 minutos durante 100 minutos. No grupo experimental [(■), n=8], foi efectuada uma estimulação inicial (10 minutos). Seguiu-se depois o protocolo do grupo controlo ao qual foi adicionada uma estimulação por doses sucessivamente maiores de tramadol administradas IV (3 µmol/kg aos 10 minutos; 6 µmol/kg aos 35 minutos; 16 µmol/kg aos 60 minutos; 33 µmol/kg aos 85 minutos).

Neste estudo, o tramadol demonstrou capacidade de inibir a libertação de saliva provocada por estimulação (aplicação de 20 µl de ácido cítrico 0,5 M a cada 30 segundos durante 10 minutos), mas falhou na inibição após a estimulação exógena por administração de acetilcolina, chegando mesmo a aumentar consideravelmente a libertação de saliva para concentrações mais elevadas. Desta forma, é, assim, de reconsiderar as acções antimuscarínicas do tramadol nesta situação.

Este aumento da resposta glandular à acetilcolina com o tramadol está relacionado com o seu mecanismo de acção, inibição da recaptção de monoaminas, neste caso noradrenalina, nos terminais nervosos glandulares, actuando de modo sinérgico com a acetilcolina.

No entanto, quando avaliada a resposta a estímulos gustativos o tramadol demonstrou capacidade de diminuir a resposta das glândulas salivares em cerca de metade da resposta basal (Fig. 11). Esta resposta parece estar relacionada com a inibição do arco reflexo salivar e não com uma depressão central do sistema nervoso, já que alguns ratos só para as dose mais elevadas é que demonstravam alguma sedação.



**Figura 11** – Fluxo de saliva após aplicação de ácido cítrico. (*Adaptado de:* Gotrick e Tobin, 2004).

É, assim, de crer que o tramadol exerce a sua acção xerogénica essencialmente via inibição central dos mecanismos que levam à libertação de saliva e não tanto através da inibição dos mecanismos colinérgicos glandulares, onde aliás demonstrou aumentar a concentração de neurotransmissores adrenérgicos.

Uma vez que a recolha de saliva para despiste de consumo de medicamentos ou drogas de abuso é efectuada através de um sistema que implica a estimulação central da produção de saliva, já que mimetiza o estímulo gustativo, devem ser considerados também neste caso, algumas dificuldades na recolha de amostras biológicas em consumidores deste medicamento.

### 3 – DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE TRAMADOL E AMITRIPTILINA

#### 3.1 - Análise em Saliva

Nos últimos anos tem crescido o interesse na utilização de saliva como matriz biológica para a triagem de drogas e outras substâncias medicamentosas em condutores que possam estar sob o estado de influenciado, mas já em 1938 Friedemann pesquisou a excreção de álcool na saliva, em 1972 Leute e col. utilizavam esta matriz na pesquisa de opióides narcóticos e em 1983 Peel e col. avaliaram a concentração de diferentes drogas na saliva de condutores. Têm sido, assim, muitos os estudos realizados no âmbito da detecção de drogas de abuso em saliva, particularmente de cocaína e seus metabolitos (Inaba e col., 1978; Peel e col., 1984; Cone, 1993; Cone e col., 1994; Jenkins e col., 1995; Cone e col., 1998), de morfina (Goldberger e col., 1993; Jenkins e col., 1995), de codeína (Sharp e col., 1983; Cone, 1990), de metadona (Verebey e col., 1980; Kang e Abbott, 1982), de anfetaminas (Martin e col., 1977; Suzuki e col., 1989; Turner e col., 1991; Wan e col., 1978) e de canabinóides (Concheiro e col., 2004; Laloup e col., 2005; Teixeira e col., 2005). Também outras substâncias, tais como medicamentos e álcool, têm sido avaliados, nomeadamente por poderem induzir efeitos psicotrópicos, sendo por isso considerados perigosos para a condução. Nesta área existem diversos estudos referentes às benzodiazepinas (Kintz e col., 2005; Skurtveit e col., 2002; Tjaden e col., 1980), a barbitúricos (Dilli e Pillai, 1980; Haginaka e Wakai, 1987; Knott e Reynolds, 1989) e etanol (Christopher e Zeccardi, 1992; Jones, 1993).

A matriz de saliva tem sido igualmente seleccionada, activamente, para a triagem de amitriptilina (Castro, 2008; Concheiro, 2008) e tramadol (Moore e col., 2006).

### 3.2 - Métodos de Confirmação

A realização de ensaios de confirmação permite, além da detecção e identificação da substância em estudo, a sua quantificação.

Em toxicologia, é necessário proceder à detecção e identificação de todo e qualquer xenobiótico que possa ser responsável por uma determinada intoxicação, procedendo em seguida à sua quantificação. Em muitas situações, as concentrações presentes nas amostras são muito reduzidas, sendo por isso necessário aumentar a sensibilidade dos métodos. Tendo por base este objectivo, têm sido utilizados detectores de espectrometria de massa (acoplados a sistemas cromatográficos) graças à sua elevada sensibilidade.

Nesta conformidade, houve uma grande evolução na análise toxicológica de substâncias e seus metabolitos em amostras biológicas, em especial desde o aparecimento de técnicas que complementam as técnicas cromatográficas, com a associação de detectores de massa, trazendo um acréscimo notório à especificidade e sensibilidade (Maurer, 2006).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) começou a ser desenvolvida nos anos 80 e obteve um grande sucesso, já que apresentava um elevado poder de identificação e de separação, em associação à elevada sensibilidade (Maurer, 1992; Maurer, 2004). No entanto, a GC-MS apresenta algumas desvantagens, já que não pode ser aplicada a substâncias polares, termolábeis (a amostra passa através da coluna na fase de vapor) ou de elevado peso molecular. Além destas limitações, é de considerar o processo moroso de preparação da amostra, já que requer, por vezes, processos extractivos complexos e em alguns casos a obrigatoriedade de derivatização de alguns compostos (Marquet e Lachâtre, 1999).

Com o objectivo de ultrapassar estes problemas, foram aproveitados os estudos que Alpino e seus colaboradores desenvolveram em 1974, sobre os primeiros métodos por LC-MS. Esta técnica apresenta vantagens significativas para a investigação de substâncias polares, de elevado peso molecular e termolábeis, já que é possível efectuar a sua análise directa. Foi nos anos 90 que se começou a utilizar, em toxicologia analítica, a cromatografia líquida em associação com a espectrometria de massa (Hoja e col., 1997; Maurer, 1998), tendo sido sujeitos a constantes

aperfeiçoamentos, de modo a que se pudessem ultrapassar as dificuldades que surgissem com a sua utilização.

Cerca de 70% das amostras processadas em laboratórios toxicológicos são analisadas por LC. No entanto, a utilização deste sistema acoplado a um espectrómetro de massa é mais dispendiosa do que se acoplado a um sistema de GC, sendo assim uma causa para a sua menor utilização.

### **3.2.1 – Cromatografia Líquida de Alta Resolução/Espectrometria de Massa**

#### **I – Cromatografia Líquida de Alta Resolução**

A LC é um método utilizado para separar, identificar e quantificar substâncias a partir de diferentes tipos de amostra.

A separação ocorre através de um mecanismo de interacção selectiva entre as moléculas presentes na amostra e duas fases, uma móvel e outra estacionária. Os diferentes constituintes da amostra, devido às suas características físico-químicas específicas, interagem de modo distinto com as fases móveis e estacionárias, resultando daí diferentes velocidades de migração, permitindo o desenvolvimento da separação cromatográfica (Chust, 1990).

É na fase estacionária (coluna cromatográfica) que ocorre o processo de separação molecular, sendo, por isso, a sua selecção um passo crítico para o sucesso de uma metodologia (Mendham e col., 2002). A escolha de uma coluna cromatográfica depende de diferentes factores, entre os quais as características intrínsecas da amostra (polaridade, carga iónica, estrutura química) e o mecanismo de separação.

A escolha da fase móvel é também de vital importância para uma separação de compostos efectiva. O seu poder de eluição depende da sua polaridade, da polaridade da fase estacionária, além da natureza dos compostos a separar.

Graças às vantagens apresentadas pelos sistemas de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), nomeadamente no que se refere à maior versatilidade na utilização da amostra anteriormente referida e também pelo elevado poder de resolução, além de se tratar de um processo de separação rápido e de grande complexidade. Estes sistemas permitem, igualmente, a monitorização contínua do

eluente, análises repetitivas e reprodutíveis, sendo também possível a automatização do processo analítico e do tratamento de dados (Mendhame col., 2002). Em relação à GC, a HPLC requer apenas que a amostra seja solúvel na fase móvel (pode ser amplamente modificada).

Este método apresenta, então, características ideais para a separação de espécies iónicas ou de macromoléculas de interesse biológico e de produtos naturais lábeis, bem como de uma grande variedade de outros compostos de elevada massa molecular e/ou baixa estabilidade térmica.

## II – Espectrometria de Massa

A espectrometria de massa é uma técnica utilizada na identificação de compostos desconhecidos, quantificação de substâncias conhecidas e na determinação de propriedades químicas e estruturais moleculares.

Por norma, a detecção de um composto através deste método pode ser efectuada sem dificuldades, quando este se encontra em concentrações tão baixas como  $10^{-15}$  g, quando tem uma massa de 1000 Dalton e mesmo quando se encontra numa mistura complexa (Taylor, 2006).

Basicamente, esta técnica utiliza a criação de iões a partir de uma molécula mãe que depois são detectados, sendo analisados os resultados tendo por base a respectiva razão massa/carga ( $m/z$ ). Note-se que o modo como estes iões são criados e depois analisados pode variar de sistema para sistema.

Os detectores de massa, quando acoplados a sistemas de HPLC, permitem acrescentar critérios de sensibilidade, versatilidade e universalidade, potenciado a sua utilização. As maiores dificuldades prendem-se com a interface, com a técnica de HPLC e o seu alto custo, quando comparado com outros detectores (Taylor, 2006).

### Ionização

Após os primeiros estudos desenvolvidos por Arpino e col., em 1974, referentes ao acoplamento de LC com MS, foram desenvolvidos diferentes estudos com o objectivo de ultrapassar as dificuldades no acoplamento destas técnicas e na inovação tecnológica de diferentes interfaces (Niessen, 2003). Os dois principais problemas desta tecnologia estão ligados à eliminação da grande quantidade de gás e

vapor procedente da fase móvel antes de entrar na região de alto vácuo do espectrómetro de massa e à transformação das moléculas em solução da fase móvel em iões em fase gasosa, sem que ocorra degradação térmica.

Uma das últimas interfaces desenvolvidas tem a particularidade da ionização se dar à pressão atmosférica (API). Nesta técnica, os iões formados são transportados desde a fonte até às regiões de alto vácuo do analisador, através de diferentes etapas de vazio separadas por diferentes lentes. Em seguida, os iões são impelidos até ao interior do MS passando através dos orifícios das lentes, por aplicação de campos eléctricos adequados.

Esta metodologia tem como principais vantagens o facto de suportar o fluxo de fase móvel utilizado na LC (noutras técnicas o fluxo deveria ser reduzido consideravelmente), poder ser efectuada a análise de compostos não voláteis, polares e termolábeis (frequentemente analisados por LC), apresentar uma elevada sensibilidade, com limites de detecção da mesma ordem de grandeza, ou inferiores, aos do sistema GC-MS, e também o facto de serem muito estáveis e de fácil manuseamento (Voyksner, 1997).

Nos dias de hoje, são aplicadas duas interfaces dentro da API, denominadas Electrospray (ESI) e Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI) – são técnicas complementares e que garantem a suficiente ionização dos compostos em estudo. Graças ao sucesso destas interfaces, têm sido as que mais são utilizadas e referenciadas em diversas publicações científicas.

#### *Interfaces de Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI)*

As primeiras referências à APCI para LC-MS remontam à década de 70, em estudos realizados por Horning e col. (1974).

Com a sonda de APCI, o líquido proveniente da LC sofre uma nebulização repentina por acção de uma fonte de calor de 300-500°C. Seria de supor que determinados compostos se degradariam a estas temperaturas, mas os elevados fluxos de gás de nebulização e de N<sub>2</sub> coaxial (gás de *make-up*) previnem a rotura das moléculas, preservando a sua estrutura e diminuindo consideravelmente a duração de contacto entre elas e as elevadas temperaturas (ao contrário do que se passa no GC-MS). Deste modo, os iões presentes na dissolução podem passar à fase de vapor.

De modo a potenciar o processo de ionização, deve ser aplicada uma voltagem de cone, de 2-6 kV, junto à saída da sonda do APCI, no *spray*. Esta corrente eléctrica ioniza as moléculas de analito, bem como as do solvente da fase móvel. Estas, por sua vez, podem transferir a sua carga à dos analitos em fase gasosa, levando à ionização química dos mesmos.

Ao se formarem moléculas protonadas e aductos com catiões, trata-se de um modo iónico positivo. Já no modo iónico negativo ocorre a combinação com aniões ou a captura electrónica.

### Interface de tipo Electrspray (ES)

O electrospray é a técnica que tem sofrido uma maior expansão, sendo já a mais utilizada e a que apresenta um maior número de aplicações.

O mecanismo físico envolvido é também utilizado noutras aplicações, tais como a produção de aerossóis para pintura, na ciência nuclear, na libertação de fármacos para inalação, entre outros processos.

Este mecanismo tem por base a descarga de um potencial eléctrico sobre um capilar, causando a rotura do solvente e a sua desintegração em pequenas gotículas (Zeleny, 1917). Nos instrumentos utilizados actualmente, associa-se, a este capilar, uma corrente coaxial de azoto, de forma a melhorar a produção do *spray* em situações de elevados caudais de fase móvel, podendo atingir, assim, fluxos de fase móvel superiores a 200 µl/min, sem que ocorra perda de sensibilidade (Bruins e col., 1987).

As soluções são assim pulverizadas electrostaticamente, formando-se pequenas gotas altamente carregadas, sofrendo, em seguida, uma nebulização (em alguns casos facilitada por um gás nebulizador). Posteriormente, as moléculas de analito são separadas do solvente na forma de iões, ainda que por mecanismos não completamente esclarecidos.

A primeira teoria defendida por Dole e col. (1968) aplicada a macromoléculas considera que, à medida que o solvente se evapora, a densidade de carga à superfície aumenta até que as forças repulsivas de Coulomb entre as cargas superficiais excedam a tensão superficial levando, então, à divisão da gota inicial. Continuando

este processo de divisão, será atingido um ponto em que cada gota conterá apenas uma molécula que irá adquirir parte da carga inicial, formando-se macro-iões.

Irbarne e Thomson, em 1976, sugeriram o mecanismo de evaporação iónica em que a evaporação do solvente conduz a uma instabilidade das gotas com razões elevadas de densidade de carga superficial/raio da gota. A energia electrostática associada a cada gota carregada torna-se, então, suficientemente grande para desadsorver iões do analito para a fase gasosa. Este mecanismo foi aplicado em macromoléculas, por Fenn e col. (1988), os quais propuseram que uma parte da molécula carregada podia penetrar a superfície da gota devido a movimentos Brownianos. A existência de repulsão coulombiana entre esta parte da molécula e a superfície da gota puxará a molécula para fora da gota.

Esta metodologia tem a capacidade de produzir iões multiplamente carregados, com número de cargas elevado, reduzindo, assim, a razão  $m/z$  e tornando possível a análise de compostos de elevada massa molecular, em praticamente todo o tipo de analisador. As amostras a analisar devem ser introduzidas em solução, o que faz com que seja possível a associação com muitas técnicas de separação. É também de referir que o electrospray é uma técnica de ionização suave, que permite que as interacções não covalentes moleculares em solução sejam preservadas na fase gasosa (Fenn e col., 1989; Gaskell, 1997; Cech e Enke, 2001; Taylor, 2006).

A eficiência da ionização por electrospray está dependente da composição da fase móvel (volatilidade, tensão superficial, viscosidade, pH e concentração electrolítica) e das propriedades do composto em causa (pKa, hidrofobicidade, energias de solvatação iónica) (Taylor, 2006).

Uma característica importante e diferenciadora do interface ESI em LC-MS é o facto de se comportar como um dispositivo concentração-dependente, já que a resposta é directamente proporcional à concentração de analito que entra na fonte, sem ocorrer qualquer interferência por parte do fluxo da fase móvel utilizada.

A espectrometria de massa com electrospray sofreu um rápido crescimento, tornando-se numa técnica analítica fundamental para análise de compostos polares, não voláteis e termicamente instáveis, adaptando-se a moléculas de diferentes pesos moleculares. Tendo atingido um elevado patamar de sensibilidade e de especificidade esta técnica vai com certeza desempenhar um papel fundamental em estudos futuros na área de acoplamento a técnicas de separação.

### 3.3 – Métodos de preparação e/ou extracção de amostras

Em grande parte das investigações toxicológicas, é necessário proceder à preparação da amostra, de modo a que se possam remover grande parte dos interferentes que constituem a matriz, que podem vir a dificultar ou mesmo impedir a análise.

De seguida, é necessário efectuar uma extracção a partir da matriz, para que se possam isolar os analitos. Este processo extractivo é um passo fundamental no desenvolvimento do método analítico.

Com estes dois passos procura-se a purificação e a concentração dos extractos.

Através do processo de preparação da amostra, procuramos converter a matriz biológica numa forma que permita a sua análise pelos métodos de confirmação, no caso deste trabalho por LC-MS, retendo ao mesmo tempo a maior quantidade possível do analito em causa. Dada a elevada sensibilidade do método de detecção por espectrometria de massa, tem sido sugerida a dispensa do passo de preparação (ou apenas uma preparação mínima) (Taylor, 2006).

Um processo extractivo é, por norma, moroso, uma vez que envolve a eliminação de substâncias interferentes e a concentração e estabilização dos analitos presentes, pretendendo-se uma optimização das condições da amostra.

Uma matriz biológica tem, na sua constituição, diversos elementos que vão desde grandes moléculas proteicas a simples sais orgânicos, podendo, cada uma delas, ser um potencial interferente na nossa análise. Deste modo, é de grande relevância uma preparação correcta da amostra, de forma a minimizar os potenciais efeitos que estas matrizes possam ter nos resultados obtidos, nomeadamente ao nível da sensibilidade. Como tal, tem sido defendido ser necessária, quase sempre, uma correcta preparação da amostra para que se possam atingir resultados quantitativos de confiança e para que se possam determinar baixos limites de detecção (Buhrman e col., 1996; <sup>a</sup>Matuszewski e col., 1998; <sup>b</sup>Matuszewski e col., 1998).

A preparação da amostra, antes da sua análise por LC-MS, tem como objectivos:

- O mínimo de perda de amostra com uma boa recuperação dos analitos de interesse;
- Remoção eficiente de outros potenciais compostos interferentes;

- Concentração dos analitos;
- Resultados independentes da variabilidade da matriz;
- Compatibilidade entre o extracto final e os sistemas de cromatografia e de espectrometria de massa;
- Conversão dos analitos numa forma adequada de detecção;
- Constituição de um processo conveniente e rápido.

Quando se pretende desenvolver um método de determinação por LC-MS, as técnicas mais utilizadas são a extracção líquido-líquido (LLE) e a extracção por fase sólida (SPE).

Interessa-nos, assim, associar à pureza da amostra obtida após a extracção, que ela permita uma correcta separação cromatográfica.

No nosso estudo foi seleccionado como método extractivo a extracção em fase sólida, seguindo os mesmos passos para ambas as substâncias em estudo.

### **3.3.1 – Extracção Líquido-Líquido (LLE)**

A LLE tem sido amplamente utilizada nas mais diversas áreas que envolvem a química analítica. Este processo extractivo baseia-se na diferente solubilidade dos compostos em diferentes solventes, ocorrendo a transferência de um soluto de um líquido para outro. Pode ser utilizada para remover selectivamente uma determinada substância a partir de uma matriz ou para remover as impurezas que nela se encontrem. A selectividade desta extracção pode ser alterada por modificação do pH no processo extractivo. Estão envolvidas, neste processo extractivo, duas fases imiscíveis, por norma, uma aquosa e outra orgânica.

Este método tem como principais desvantagens a morosidade, a fraca automação e a possibilidade de poder surgir uma terceira fase (emulsão) que complica o processo de separação, além da problemática ambiental criada pela utilização de grandes quantidades de solventes orgânicos (Taylor, 2006).

### 3.3.2 – Extração Sólido-Líquido (SPE)

Ao longo de vários anos, a LLE foi escolhida como método de eleição para a preparação de amostras, geralmente associada a um pré-tratamento que poderia incluir a hidrólise de conjugados, a digestão da matéria orgânica e a precipitação proteica. Em meados da década de 70 surge, então, a SPE, apresentando-se como uma técnica simples e prática para a preparação de amostras.

Este método baseia-se na utilização de pequenas colunas de extração, descartáveis, preenchidas com uma variedade de enchimentos (adsorventes), permitindo uma separação eficaz dos componentes da matriz. Em relação à LLE a SPE apresenta diversas vantagens, tais como:

- Tempo de preparação reduzido;
- Elevadas taxas de recuperação;
- Extractos purificados;
- Possibilidade de automação;
- Compatível com a análise cromatográfica;
- Processamento conjunto de várias amostras;
- Adaptável a diferentes volumes de amostra;
- Não ocorre formação de emulsões.

Todas estas características tornam este processo o mais utilizado em procedimentos analíticos por LC-MS (Jemal, 2000).

Uma vez que podem existir diferentes preenchimentos nas colunas, a especificidade de extração pode ser muito aumentada, já que existe a possibilidade de escolher uma coluna que contenha o suporte que interaja mais especificamente com a molécula em estudo. Estas interações estabelecem-se entre as moléculas do analito e os grupos funcionais do preenchimento da coluna (interações polares, hidrofóbicas e iónicas). Já a LLE encontra-se limitada à variação dos coeficientes de partilha entre as diferentes fases envolvidas no processo (McDowall, 1989). A selectividade adicional proporcionada por esta técnica leva a uma diminuição da possibilidade de efeitos da matriz biológica, o que permite ao analista atingir menores tempos de corrida na técnica cromatográfica utilizada, além de obter uma elevada reprodutibilidade (D'Asaro, 2000).

As colunas de extracção por fase sólida permitem a separação dos compostos retendo-os no suporte sólido que as constitui, sendo posteriormente eluidos por aplicação de um solvente adequado e recolhidos num recipiente adequado. Os solventes utilizados na preparação da amostra através da SPE podem ser forçados a passar pela coluna por aplicação de uma pressão positiva (pressão gasosa), pressão negativa (vácuo), gravidade, centrifugação ou pela utilização de bomba de alta pressão (Zweipfenning e col., 1994).

Esta extracção segue, por norma, quatro passos. Em primeiro lugar é efectuado o acondicionamento da coluna. Com este passo procura-se embeber o suporte sólido da coluna e solvatar os seus grupos funcionais, funcionando como uma activação da coluna, variando os solventes utilizados de acordo com o tipo de extracção a efectuar. Geralmente é utilizado o metanol, seguido de água ou uma solução tampão, activando o sistema de adsorção, para amostras aquosas. Com este passo conseguimos melhorar a reprodutibilidade do método já que, além de preparar a coluna para receber a amostra, ocorre a remoção de impurezas e eliminação do ar residual, substituindo-se os espaços vazios por solvente.

De seguida, efectua-se a adição de amostra, com o objectivo de reter e concentrar (ligado ao suporte sólido da coluna) o composto desejado. Esta retenção ocorre por estabelecimento de ligações de van der Waals (fracas, hidrofóbicas, apolares, de partição ou de fase reversa), ligações por pontes de hidrogénio, forças dipolo-dipolo e troca iónica.

Para que possa ficar retido na coluna apenas o composto em pesquisa, deve ser realizada uma lavagem da coluna, com um solvente adequado que vai arrastar selectivamente os interferentes da matriz. Quando se utilizam amostras aquosas, poderá ser utilizado um tampão aquoso ou uma mistura água/solvente orgânico.

De modo a poder recolher a substância desejada, é feita a eluição utilizando um volume determinado de eluente (Lingeman e col, 1997). O eluente actua quebrando as ligações que se estabelecem entre as moléculas do composto e os grupos funcionais da fase sólida da coluna. Ao mesmo tempo, o eluente deve preservar as possíveis ligações entre a coluna e outras moléculas que não são do interesse da pesquisa, para que, assim, se recolha a totalidade do analito e a menor quantidade possível dessas substâncias que podem ser interferentes.



# Parte I

## *Capítulo V*

*Projecto DRUID*

*Driving Under the Influence of  
Alcohol, Drugs and Medicines*



## 1 – RESUMO DO PROJECTO E SEUS OBJECTIVOS

Mais de 40.000 indivíduos morreram e cerca de 1.7 milhões sofreram ferimentos graves nas estradas, no ano 2000, na União Europeia (UE) (15 estados membros). A UE fixou, assim, a data de 2010 para reduzir o número de fatalidades em 50%. Como o número dos acidentes que podem ser atribuídos às substâncias psicotrópicas (álcool, drogas e determinados medicamentos) é constantemente elevado e com o consumo de drogas e de medicamentos a aumentar proporcionalmente cada ano, há que dirigir todos os esforços no sentido de elucidar vários aspectos que envolvem este problema, e desenvolver as soluções apropriadas.

Um dos campos de intervenção é, com certeza, a condução sob a influência de drogas e medicamentos, fenómeno descrito recentemente como um dos factores de risco cada vez mais preocupante.

Nessa orientação, foram recomendadas algumas medidas para lutar contra este flagelo tais como, a aplicação de um procedimento harmonizado para detecção de drogas ilícitas em todos os condutores implicados em acidentes de viação que causem vítimas mortais, a introdução de aparelhos de detecção rápida, uma formação adequada dos agentes de autoridade implicados na segurança rodoviária e a realização de vários estudos de prevalência, de controlo e de reabilitação (Raes e Verstraete, 2006).

Para tal apontam alguns dos projectos europeus até agora realizados ou em desenvolvimento: CERTIFIED ([www.DUI-DWI.com/drugged-driving-european-study-of-impairing-effects.html](http://www.DUI-DWI.com/drugged-driving-european-study-of-impairing-effects.html)); IMMORTAL - Impaired Motorists Methods of Roadside Testing and Assessment for Licensing ([www.immortal.or.at](http://www.immortal.or.at)) e, mais recentemente, o projecto “Driving under influence of alcohol, drugs and medicines” (DRUID).

O projecto DRUID tem como objectivo debater toda a problemática álcool/condução e ir ao encontro de respostas para todas as questões que se prendem com o uso de substâncias estupefacientes e psicotrópicas e sua acção e influência na capacidade da condução em segurança ([www.druid-project.eu](http://www.druid-project.eu)).

De uma forma geral, o projecto DRUID pretende dar um contributo experimental e científico a toda a problemática e política do controlo rodoviário na UE, de forma a permitir o estabelecimento em 2010, de guidelines e medidas

necessárias ao combate da condução sob influência de álcool e substâncias estupefacientes e psicotrópicas. Pretende-se com este estudo:

- Conduzir estudos de referência sobre a capacidade de condução sob influência de álcool, drogas ilícitas e medicamentos e seu real impacto na segurança rodoviária;
- Gerir recomendações para a definição de aspectos particulares analíticos e de risco;
- Analisar a prevalência do álcool e outras substâncias psicotrópicas nos acidentes de viação e na condução em geral, definindo uma base de dados epidemiológica detalhada e eficiente;
- Avaliar a “boa prática” para a detecção e de medidas de treino para as entidades fiscalizadoras policiais, permitindo uma avaliação legal dos condutores;
- Estabelecer um sistema de classificação apropriado para os medicamentos que influenciam a condução e fornecer recomendações para a sua implementação;
- Avaliar a eficiência das estratégias de prevenção, penalização e reabilitação, tendo em conta as dificuldades na avaliação apropriada das estratégias aquando o uso combinado de substâncias;
- Definir a responsabilidade dos profissionais de saúde para com os pacientes que consomem substâncias psicotrópicas e seu impacto na segurança rodoviária, elaborar *guidelines* e tornar disponível e aplicável toda a informação a todos os países Europeus.

### 1.1 – Coordenação do projecto DRUID

A Comissão Europeia está a promover este estudo científico de nível europeu, o anteriormente mencionado Projecto DRUID, envolvendo a determinação de álcool etílico e de substâncias estupefacientes e psicotrópicas em condutores. Pretende-se a obtenção de uma avaliação estatística fundamentada na prevalência do consumo destas substâncias em condutores da União Europeia, elemento fundamental para o delinear de estratégias posteriores de intervenção. A investigação em causa terá uma duração de quatro anos, sendo coordenada pelo Prof. Horst Schulze do *Federal Highway Research Institute*, da Alemanha.

Este projecto está dividido em sete áreas, designadas “Work Packages”, envolvendo, cada uma delas, vertentes distintas, da reabilitação aos estudos de metodologia e desenvolvimento experimental, de recomendações e riscos a estudos epidemiológicos e cálculo relativo do risco.

## 1.2 – Países que integram o projecto DRUID

São, no total, 18 os países que fazem parte integrante do projecto global referido: Portugal, Alemanha, Dinamarca, Grécia, França, Polónia, Bélgica, Holanda, Espanha, Suécia, República Checa, Áustria, Itália, Noruega, Finlândia, Eslovénia, Hungria e Lituânia (Fig 11). Alguns, (Portugal, Noruega, Suécia, Polónia, Espanha e República Checa), terão a seu cargo a realização do estudo em condutores. Outros, (Dinamarca, Bélgica, Holanda, Itália, Finlândia, Lituânia e Hungria), irão realizar não só em condutores (na estrada), mas também em vítimas de acidentes rodoviários admitidas em hospitais.

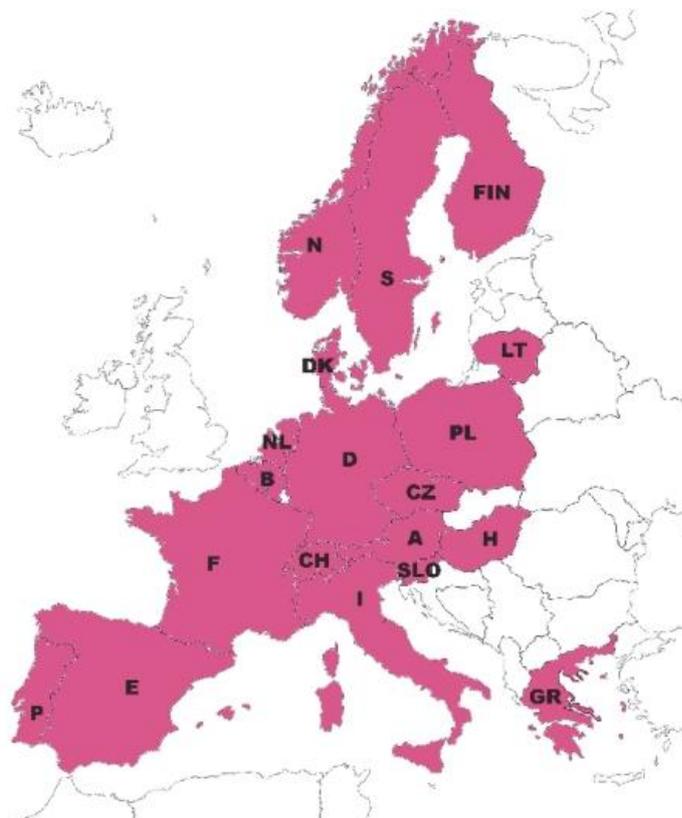


Figura 12 – Países integrantes do projecto DRUID.

## 2 – PARTICIPAÇÃO PORTUGUESA

A participação portuguesa enquadra-se no designado “Work Package 2 (WP2)” e consistirá num estudo envolvendo uma componente prática na estrada (recolha de amostras em colaboração com as forças policiais competentes) e uma componente laboratorial (análise químico-toxicológica das amostras biológicas recolhidas, com detecção, confirmação e quantificação das substâncias em causa, nos três Serviços de Toxicologia Forense do Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P.). A concretização implica o envolvimento de condutores das três áreas do país (norte, centro e sul), seleccionados aleatoriamente em colaboração com as forças policiais, no âmbito de controlos rodoviários promovidos em diferentes locais e a diferentes horas.

Mais especificamente, e nos termos do estudo aprovado pela Comissão Europeia, pretende-se que a participação nacional envolva:

- Vinte e quatro controlos na estrada, para cada STF, entre Janeiro de 2008 e Junho de 2009; Sessenta amostras por controlo, com um total de, aproximadamente, 4000 amostras de condutores para todo o país;
- Substâncias a determinar no estudo: etanol, metadona, opiáceos (codeína, morfina e heroína), (met) anfetaminas (incluindo MDMA, MDEA e MDA), cocaína, cannabis, uma selecção de benzodiazepinas, zolpidem, zopiclone e barbitúricos. Todas as substâncias mencionadas foram determinadas como obrigatórias para análise em todos os países participantes. No entanto, surgiu a possibilidade da inclusão de substâncias adicionais, de acordo com decisão própria de cada país. Assim sendo, em Portugal foi decidido adicionar a amitriptilina e o tramadol em virtude de pertencerem ao grupo de substâncias mais consumidos no nosso país, podendo afectar claramente as capacidades cognitivas e psicomotoras de um indivíduo, incompatíveis com uma condução segura;
- Amostras a colher de cada condutor: saliva para análise de drogas e ar expirado para a determinação de etanol;

▪ Realização de toda a parte laboratorial nos três Serviços de Toxicologia Forense do Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P.. Esta componente laboratorial consiste no desenvolvimento de uma metodologia analítica que permita a determinação de todos os compostos anteriormente referidos em saliva e sua posterior validação (separadamente para cada composto avaliado). Neste contexto, as duas substâncias complementares adicionadas para análise neste projecto, amitriptilina e tramadol, são o objecto de estudo deste trabalho.

Passar-se-á, com este projecto, a dispor de uma investigação e consequentes dados epidemiológicos complexos, mas realistas, à semelhança de outros estudos e de outros países, tal como foi demonstrado anteriormente, permitindo uma avaliação da situação no nosso país em matéria de consumo de substâncias lícitas e ilícitas no exercício da condução rodoviária, até à data não existente.



# Parte II

*Definição e Justificação dos  
Objectivos*



## 1 – FUNDAMENTOS GERAIS PARA A DEFINIÇÃO DOS OBJECTIVOS

Se, por um lado, o consumo de medicamentos tem contribuído ao longo dos anos para o aumento generalizado da qualidade de vida, é também certo que os efeitos secundários por si induzidos podem limitar algumas das mais comuns acções diárias de inserção na sociedade, sendo por isso bastante limitativas da liberdade individual. Uma dessas acções é, sem dúvida, a condução. No mundo moderno de hoje ficar condicionado pela limitação de conduzir é, em grande parte das situações, incomportável, já que muitos dos empregos implicam uma elevada mobilidade e mesmo em termos sociais, perder a liberdade de se poder fazer o que se quer, quando se quer, é muito constrangedor.

A condução é uma actividade complexa que requer o normal funcionamento de diversos processos cognitivos, além da normal apetência física.

O tramadol e a amitriptilina pertencem ao grupo de medicamentos que podem, pelos efeitos secundários que induzem, provocar limitações ao acto de conduzir.

O tramadol é analgésico opióide de origem sintética, comercializado sob diferentes formas farmacêuticas e apenas passível de serem adquiridas mediante apresentação de prescrição médica válida. A sua utilização pode provocar diferentes efeitos secundários, por norma dependentes da dose, que podem interferir com a condução, sendo os mais relevantes os provocados sobre o sistema nervoso central, tais como sedação e tonturas, em especial se for utilizado concomitantemente com outros psicofármacos e/ou álcool.

A amitriptilina é um potente antidepressivo tricíclico que, apesar do seu consumo ter vindo a diminuir, continua ser bastante utilizado, especialmente em situações depressivas major ou que não respondem a outras terapêuticas. A nível fisiológico, a amitriptilina é responsável por diversos efeitos secundários que são responsáveis pela diminuição do seu consumo ao longo dos últimos anos. As alterações que provoca ao nível dos processos cognitivos, além da sedação relatada por grande parte dos utilizadores, tornam a amitriptilina num psicofármaco com grande potencial de limitação da condução.

No âmbito da legislação actualmente em vigor no nosso país, estas substâncias não são passíveis de detecção imediata quando é efectuada uma fiscalização na estrada ou após um acidente de viação. No entanto, poderá ser requerida uma análise

posterior, sob ordem judicial, pesquisando a presença no sangue de qualquer substância psicotrópica que tenha influência na capacidade de condução. Daqui advém a importância do desenvolvimento de um método que utilize uma amostra biológica que, ao mesmo tempo que demonstre sensibilidade, seja o menos invasivo e moroso possível, tal como acontece com a saliva.

Dado o impacto negativo que os acidentes de viação continuam a ter no nosso país e em todo o mundo, o desenvolvimento de projectos como o “Driving under the influence of drugs” (DRUID), a nível europeu, é de elevada relevância não só para poder determinar o papel dos medicamentos na condução e nos acidentes rodoviários mas também para permitir criar métodos de prevenção e de sensibilização adequados para que no futuro esses acidentes não passem disso mesmo. Portugal, através do Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P., ao participar neste estudo, procurou desenvolver técnicas que permitissem a detecção e quantificação de diversos medicamentos e drogas de abuso exigidos pela coordenação do projecto, aos quais propôs acrescentar o tramadol e a amitriptilina.

Para ambas as substâncias, podemos encontrar variada literatura com referências à sua determinação noutras matrizes biológicas (ex. sangue), utilizando diferentes métodos de detecção e quantificação (ex. GC-MS). No que se refere à sua pesquisa em saliva a literatura é escassa e utiliza um sistema LC-MS-MS que dá outras possibilidades a um estudo como este, nomeadamente em termos de sensibilidade. No entanto, devido ao seu elevado custo, nem sempre pode estar disponível na maior parte dos laboratórios de toxicologia forense.

Assim, e no âmbito do projecto europeu DRUID procurou-se desenvolver um método por LC-MS para a detecção e quantificação de tramadol e de amitriptilina em saliva.

## 2 – OBJECTIVOS GERAIS E OBJECTIVOS ESPECÍFICOS

Em termos gerais, o objectivo deste trabalho foi desenvolver um método analítico devidamente validado que permitisse proceder à determinação simultânea de tramadol e amitriptilina em amostras de saliva recolhidas a voluntários condutores no âmbito de um projecto europeu (DRUID), utilizando um sistema de cromatografia

líquida de alta resolução (LC), acoplado a um detector de espectrometria de massa (MS), com ionização por *electrospray*.

Ao desenvolver este método procurou-se alcançar uma metodologia nova, em especial considerando a matriz utilizada (saliva), que permitisse atingir baixos limites de detecção e quantificação de amitriptilina e tramadol, sem recorrer ao sistema LC-MS-MS, mais dispendioso, ou ao GC-MS, mais moroso e com algumas limitações quanto ao tipo de amostra, e que pudesse ser aplicada em posteriores estudos de toxicocinética ou a casos reais, voluntários ou de perícia médico-legal.

Este estudo iniciou-se pelo desenvolvimento de uma metodologia que permitisse a determinação de tramadol e amitriptilina, em saliva, seguindo todos os passos de validação exigidos, sendo posteriormente aplicado a amostras reais de condutores.

**2.1** – A pesquisa de amostras alternativas, em toxicologia forense, é uma constante já que em determinadas situações umas amostras demonstram ser mais vantajosas do que outras. Além disso, nem sempre estão disponíveis ou são de fácil recolha as amostras normalmente utilizadas, sendo por isso importante estabelecer novos métodos utilizando novas matrizes.

Neste aspecto, a relevância da saliva como matriz tem vindo a crescer, como acontece, por exemplo, na fiscalização da condução sob o efeito de substâncias psicotrópicas (medicamentos e drogas de abuso). É necessário, no entanto, que os resultados obtidos demonstrem exactidão, precisão e que sejam de fácil interpretação.

Assim sendo, tornou-se numa necessidade o desenvolvimento de um método por cromatografia líquida de alta resolução com espectrometria de massa (LC-MS) capaz de atingir baixos limites de detecção de tramadol e amitriptilina em saliva.

Neste sentido, para a aferição do método analítico escolhido para determinar e quantificar o tramadol e a amitriptilina, foram desenvolvidos inúmeros estudos e experiências preliminares que conduziram à escolha final mais adequada e satisfatória. Tais como:

- Escolha de diferentes condições operacionais quer a nível da detecção quer da separação cromatográfica propriamente dita;

- Escolha e utilização de diferentes colunas cromatográficas;
- Escolha e utilização de diferentes fases móveis;
- Escolha e utilização de diferentes processos de preparação e extracção das amostras de saliva;
- Estudo e aplicação de cada parâmetro de validação, avaliação e interpretação dos resultados obtidos.

**2.2** – Após ter sido atingido com sucesso o objectivo de desenvolver e validar um método exacto, preciso, específico e selectivo para o tramadol e para a amitriptilina, o passo seguinte foi o de aplicá-lo a amostras reais.

Os resultados obtidos em associação com os do projecto DRUID podem vir a ser considerados relevantes para o estabelecimento de novas deliberações por parte dos órgãos competentes no âmbito da utilização destas substâncias psicotrópicas por parte de condutores.

Este objectivo foi alcançado pela participação em duas operações de fiscalização com a PSP e com a GNR – Secção de Trânsito, no âmbito do projecto europeu DRUID, onde foram recolhidas 35 amostras de condutores (consumidores de medicamentos ou não) que aceitaram participar voluntariamente e sob total anonimato.

O estudo consistiu em:

- Recolha de amostras de saliva, através do dispositivo Saliva Sampler™;
- Elaboração de um inquérito (previamente estabelecido pela coordenação do projecto DRUID), destinado a avaliar alguns parâmetros interpretativos no âmbito do trabalho de investigação;
- Aplicação da metodologia validada às amostras de saliva previamente preparadas, avaliação e interpretação dos resultados obtidos.

# Parte III

*Contribuição Pessoal*  
*Trabalho Experimental*



# Parte III

## *Capítulo I*

*Caracterização do Método  
Analítico para Determinação de  
Tramadol e Amitriptilina em  
Saliva*



## 1 – INTRODUÇÃO

Os métodos analíticos seleccionados para a identificação e quantificação de substâncias, em qualquer tipo de matriz em que elas se encontrem, devem garantir resultados reprodutíveis e fiáveis. A escolha do método depende, não só das características específicas da substância em análise (características físico-químicas e concentração), como da matriz em que ela se encontra (características físico-químicas e presença de outras substâncias interferentes).

Para que se possa garantir a qualidade, a segurança e a reprodutibilidade dos resultados obtidos, o método seleccionado deve ser validado segundo rigorosos critérios pré-estabelecidos. Na verdade, a fiabilidade dos resultados analíticos é de crucial importância em toxicologia forense e clínica, uma vez que constitui um pré-requisito para a interpretação correcta dos resultados toxicológicos (Peters e Maurer, 2002).

Assim, a determinação de parâmetros como especificidade e/ou selectividade, sensibilidade, limites de detecção e quantificação da substância, linearidade, precisão e exactidão, eficiência da extração e gama de trabalho, é fundamental para a credibilidade dos resultados obtidos.

Nos últimos anos tem sido objecto de discussão internacional a necessidade da existência de um consenso sobre o que deve ser validado e com que grau de profundidade, assim como a definição dos critérios de aceitação dos parâmetros de validação de métodos bioanalíticos em toxicologia forense. Deste modo, neste trabalho, a metodologia de validação baseou-se nas recomendações e critérios de organizações internacionais de marcada relevância científica (FDA, 2001; ICH Q2 (R1), 2005), em bibliografia de referência no âmbito da validação de métodos analíticos (Peters e Maurer, 2002; Gustafson *e col.*, 2003; Peters e Maurer, 2002; Peters, 2006), bem como no procedimento técnico definido para o Serviço de Toxicologia Forense para a validação de ensaios no âmbito do processo de acreditação em curso.

## 2 – DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

### I – ESPECIFICIDADE/SELECTIVIDADE

A especificidade e/ou selectividade de um método pode ser definida como sendo a capacidade de um método analítico para determinar e discriminar inequivocamente a substância em estudo, diferenciando-a de outros componentes que possam estar presentes na amostra (impurezas, produtos de degradação, excipientes ou compostos relacionados). A selectividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse, sendo um dos primeiros passos no desenvolvimento e validação de um método. Tal deverá também ser reavaliado continuamente, uma vez que certas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos não observados inicialmente e que podem co-eluir com a substância de interesse. Pode acontecer que o método não seja específico mas a interferência ser pequena e relativamente estável, permitindo que, a partir do limite de quantificação do analito, deixe de ter relevância.

### II – LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO

#### *Limite de Detecção (LOD)*

De acordo com a ICH Q2, o limite de detecção de uma substância define-se como a menor concentração da substância que pode ser detectada e diferenciada do ruído de fundo do cromatograma sem, no entanto, ser ainda possível quantificá-la por insuficiente precisão e exactidão.

No nosso estudo, o LOD foi definido como sendo a mínima concentração na qual a razão sinal/ruído do respectivo ião do composto (determinada pela altura do pico) foi  $\geq 3/1$ , e onde os aspectos cromatográficos (forma do pico e resolução) e tempo de retenção relativo ( $\pm 2\%$  do RT alvo) foram aceitáveis.

### *Limite de Quantificação (LOQ)*

Corresponde à menor concentração da substância que pode ser determinada e quantificada com precisão e exactidão, sendo a menor concentração que pode ser incluída na recta de calibração.

O LOQ foi definido como sendo a mínima concentração na qual a razão sinal/ruído do respectivo ião do composto foi  $\geq 10/1$ , com uma precisão com valores de coeficiente de variação  $\leq 20\%$ .

## **IV – LINEARIDADE/RECTA DE CALIBRAÇÃO**

Este parâmetro diz respeito à capacidade do método para dar resultados directamente proporcionais à concentração do analito dentro de uma determinada gama de trabalho, ou seja, o intervalo dentro do qual as concentrações de analito testadas mostram valores de linearidade, precisão e exactidão adequados.

A recta de calibração pode ser definida como a relação que existe entre a resposta do instrumento e as concentrações conhecidas do analito.

Para cada analito é construída uma recta de calibração, devendo ser preparada na mesma matriz que a do estudo previsto, por adição de concentrações conhecidas do mesmo. O número de pontos de calibração para a construção da recta deve ser suficiente de forma a definir, adequadamente, a relação concentração-resposta. Por outro lado, devem geralmente ser eleitos em função do intervalo de concentrações que se espera estudar.

Em todo o caso, devem ser utilizadas, no mínimo, 5 concentrações por toda a gama a estudar, sendo o modelo de concentração definido, o mais simples possível e aquele que descreve adequadamente a relação concentração-resposta.

## V – PRECISÃO E EXACTIDÃO

### *Precisão*

A precisão de um método analítico descreve a proximidade das medidas individuais do analito quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas alíquotas de um mesmo volume homogéneo de uma matriz, ou seja, permite observar o grau de concordância (grau de dispersão) entre uma série de medidas obtidas de tomas múltiplas e iguais a partir de uma amostra homogénea (FDA, 2001; ICH Q2 (R1), 2005; Peters e Maurer, 2002).

Pode subdividir-se em *precisão intra-dia ou repetibilidade*, que expressa a precisão durante o processamento de uma sequência analítica num curto período de tempo, e *precisão inter-dia ou reprodutibilidade*, que reflecte a precisão no decorrer do tempo, podendo implicar diferentes analistas, equipamentos, reagentes e, inclusivamente, laboratórios (FDA, 2001).

A precisão deve ser medida usando um mínimo de cinco determinações por cada concentração, aplicada, por sua vez, a um mínimo de três níveis de concentração dentro do intervalo de concentrações da recta de calibração.

A determinação deste parâmetro faz-se analisando a variação de conjuntos replicados de padrões de concentração conhecida, sendo expressa em termos de coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (RSD= Relative Standard Deviation), (Gustafson *e col.*, 2003).

De acordo com os critérios de validação por nós adoptados, a precisão calculada para cada nível de concentração não deve exceder 15% do coeficiente de variação (CV), excepto para o LOQ, para a qual não deve exceder 20% do CV.

### *Exactidão*

A exactidão de um método analítico descreve a proximidade entre os resultados da concentração medida pelo método analítico relativamente ao valor real ou teórico (concentração) do analito, ou seja, exprime a concordância (% de desvio) entre o valor real determinado pelo método (resultado obtido) e o valor de referência (verdadeiro valor).

A exactidão de um método pode ser afectada pelos componentes do erro sistemático (*bias*) e do erro aleatório. No entanto, a exactidão é frequentemente usada apenas para descrever a componente do erro sistemático, isto é, como *bias*, sendo definida como a diferença entre a média dos resultados de uma série de ensaios e um valor teórico aceite como exacto, podendo ser expressa como um desvio entre essa média e o valor considerado verdadeiro, ou como percentagens de recuperação de um dado analito em estudos efectuados sobre amostras fortificadas.

Este parâmetro pode ser calculado através da equação [(média das concentrações medidas - valor teórico)/ valor teórico] x 100 (Gustafson *e col.*, 2003) e expresso em percentagem (%). Os valores médios desta equação, também denominada de erro (*innaccuracy, bias*), devem situar-se dentro de  $\pm 15\%$  relativamente ao valor real (valor teórico), excepto para o valor mais baixo de quantificação (LOQ) em que um valor de  $\pm 20\%$  é aceitável (FDA, 2001; ICH Q2 (R1), 2005).

## **VI – RECUPERAÇÃO**

A recuperação ou rendimento da extracção de um analito corresponde à relação entre a concentração conhecida de analito que foi sujeita ao processo de extracção e a concentração que foi realmente analisada. A recuperação demonstra a eficácia da extracção de um método analítico dentro de determinados limites de variabilidade. A recuperação do analito não necessita ser 100%, mas deve ser constante, precisa e reprodutível (FDA, 2001). Alguns autores consideram que a recuperação não é um parâmetro essencial na validação de um método analítico, isto se a precisão, exactidão, LOQ e especialmente o LOD são adequados (Peters e Maurer, 2002).



# Parte III

## *Capítulo II*

*Desenvolvimento de um Método  
Analítico para a Detecção e  
Quantificação de Tramadol e  
Amitriptilina em Saliva*



## 1 – INTRODUÇÃO

Em Portugal, no período entre 2003 e 2007, registou-se um aumento do consumo de medicamentos de, aproximadamente, 7,5% (Estatística do Medicamento, 2007). Assim, encontra-se cada vez mais aumentada a probabilidade de haver indivíduos a conduzir sob a influência de medicamentos, quer isoladamente, quer em concomitância com outros medicamentos ou outras substâncias (álcool ou drogas de abuso) que podem potenciar os efeitos deletérios sobre a condução.

Tendo em consideração todos os riscos inerentes a esta prática, torna-se crucial o desenvolvimento de métodos cada vez mais sensíveis e de fácil aplicação, de forma a tornar a fiscalização de condutores mais rápida e eficaz.

A nível europeu têm sido desenvolvidos estudos, com o objectivo de fazer o correcto levantamento desta situação e suas implicações, como por exemplo através dos estudos CERTIFIED ([www.DUI-DWI.com/drugged-driving-european-study-of-impairing-effects.html](http://www.DUI-DWI.com/drugged-driving-european-study-of-impairing-effects.html)); IMMORTAL (Impaired Motorists Methods of Roadside Testing and Assessment for Licensing) ([www.immortal.or.at](http://www.immortal.or.at)) e, mais recentemente, o projecto DRUID (Driving under the influence of Alcohol, Drugs and Medicines), referido em capítulo anterior.

O projecto DRUID, no qual se enquadra parte deste trabalho, tem como objectivo debater toda a problemática álcool/medicamentos/drogas de abuso *versus* condução e ir ao encontro de respostas para todas as questões que se prendem com o uso de substâncias estupefacientes e psicotrópicas e sua acção e influência na capacidade da condução em segurança. Tal como referido anteriormente, este projecto inclui a determinação de diversas substâncias obrigatórias para todos os países participantes e a possibilidade da determinação de substâncias adicionais, de acordo com decisão própria de cada país. Em Portugal, foi decidido adicionar duas substâncias medicamentosas complementares, o tramadol e a amitriptilina, em virtude das mesmas apresentarem incisivas acções a nível das capacidades cognitivas e psicomotoras de um indivíduo e dado o seu elevado consumo no nosso país.

Presentemente, conforme regulamentado pela Lei nº 18/2007, de 17 de Maio, a detecção de substâncias psicotrópicas, em acções de fiscalização de condutores, inclui um exame prévio de rastreio e, caso o seu resultado seja positivo, é realizado um exame de confirmação (em sangue), da responsabilidade dos serviços de toxicologia forense do Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P. De acordo com o

artigo 11º desta lei, referente ao exame prévio de rastreio, prevê-se que sejam utilizadas, como amostras biológicas, a urina, saliva, suor ou sangue.

Assim sendo, na prática, é sempre necessário ponderar quais as vantagens de cada amostra, em particular a facilidade de colheita, e a melhor correlação com um consumo recente e o estado de influenciado. No entanto, não pode ser esquecido o facto de que os resultados obtidos têm de ser exactos, precisos e facilmente interpretáveis.

Existem diversas referências a documentar a determinação de medicamentos e drogas de abuso em amostras alternativas, tais como saliva, suor e cabelo (Kintz e Samyn, 2002; Moore e col., 2007; Skopp e col., 2007; Concheiro e col., 2008; Huestis e col., 2008).

A utilização da saliva como amostra biológica tem demonstrado diversas vantagens, tais como o facto de ser facilmente acessível, uma vez que a sua recolha é pouco invasiva, não necessitando de pessoal médico especializado e, em particular como alternativa à urina, é de difícil substituição ou adulteração (O’Neal e col., 2000).

Neste contexto, e adicionado ao facto da obrigatoriedade de cumprimento do projecto DRUID, onde Portugal participa, foi necessário desenvolver e validar uma metodologia analítica que determinasse com sensibilidade, exactidão e precisão, tramadol e amitriptilina em saliva, para posterior aplicação nas amostras dos voluntários que aceitassem colaborar no projecto, assim como toda uma posterior aplicação em Medicina Legal, mais concretamente no âmbito do controlo rodoviário.

## **2 – MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 – Substâncias Estudadas**

Pelas razões atrás determinadas e justificadas, as substâncias em estudo foram o tramadol e amitriptilina e os seus padrões internos, o tramadol-d<sub>3</sub> e diazepam-d<sub>5</sub>, respectivamente, tendo sido ambos adquiridos à empresa Promochem, Espanha. Estes últimos foram utilizados como padrões internos, uma vez que apresentam uma estrutura molecular, características físico-químicas e comportamentos cromatográficos semelhantes aos compostos em estudo, o que se traduz numa

consequente vantagem em termos de eficiência de extracção, eficiência no processo de ionização e co-eluição do analito (Taylor, 2006).

Dada a extrema importância dos padrões internos neste tipo de métodos, a sua selecção deve ser criteriosa. Os padrões internos são utilizados nos métodos quantitativos por LC-MS, para compensar as diferenças que possam existir durante a análise das diferentes amostras, não só no que respeita à eficiência do processo extractivo, mas também do processo de ionização, durante a transferência do analito da sua fase líquida para a sua fase gasosa.

## **2.2 – Reagentes/Gases**

1. Metanol grade HPLC, LiChrosolv®, Merck – Darmstadt (Alemanha)
2. Acetonitrilo grade HPLC, LiChrosolv®, Merck – Darmstadt (Alemanha)
3. Ácido Fórmico 98 – 100%, Extra-puro, Merck – Darmstadt (Alemanha)
4. Amónia, Merck – Darmstadt (Alemanha)
5. Ácido Clorídrico 32% PA, Panreac Química S.A. – Barcelona (Espanha)
6. Água Ultra-Pura Milli-Q obtida com sistema Millipore (França)
7. Azoto Alphagaz 1, Ar Líquido (Portugal)

## **2.3 – Material Utilizado**

1. Pipetas Eppendorf Research e Pipetman – Gilson
2. Centrífuga Labofuge 400 (Heraeus Instruments) e Kubota 5400
3. Agitador magnético Heidolph MR 2002
4. Banho de ultra-sons SONOREX Super RK 510H, Selecta
5. Bomba de vácuo Millipore, Waters (Huchoa-Erloss, Portugal)
6. Material de Filtração, Millipore e filtros 0,2 µm, Schleicher & Schuell (Reagente 5, Portugal)
7. Dispositivos *Saliva Sampler*<sup>TM</sup>
8. Coluna de fase reversa Atlantis<sup>TM</sup> T<sub>3</sub> (2,1x 150 mm; 3 µm), Waters
9. Colunas de extracção Oasis (MCX) 3cc (60mg), Waters

## 2.4 – Sistema de LC-MS

Foi utilizado um método analítico por cromatografia líquida de alta resolução (LC) acoplado a um detector de massa (MS), com ionização por *electrospray*, com as especificações expressas na Tabela 8.

**Tabela 8** – Principais características do sistema de LC-MS utilizado.

Sistema de Cromatografia Líquida (LC)	Detector de Espectrometria de Massa (MS)
<ul style="list-style-type: none"> <li>Alliance 2695, Waters, Injector Automático</li> <li>Bomba quaternária</li> <li>Software Waters Empower (Milford, MA) incorporado num PC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Modelo ZQ 2000, Waters</li> <li>Quadrupólo Simples</li> </ul>

A cromatografia líquida de alta resolução, tal como já foi descrito anteriormente, é uma técnica analítica de grande impacto actual e com um vasto campo de aplicações. Esta metodologia permite separar os diferentes analitos consoante as suas funções moleculares, podendo, por isso, ser utilizada para separar, identificar e quantificar substâncias em diferentes amostras, com grande exactidão e precisão. A separação é processada por meio de um mecanismo de interacção selectiva entre as moléculas de soluto (amostra) e duas fases, uma estacionária e outra móvel. As técnicas de confirmação da presença de drogas em saliva baseiam-se, cada vez mais, em técnicas de espectroscopia de massa (MS), com maior ênfase quando acopladas à cromatografia líquida (LC-MS), devido ao diminuto volume de amostra requerido por esta técnica, mas também pelos baixos limites de detecção necessários (Drummer, 2006).

O princípio da separação cromatográfica baseia-se nos diferentes graus de afinidade entre as estruturas moleculares dos componentes da amostra e a fase móvel e a fase estacionária. Assim, as suas velocidades de migração ao longo da coluna vão ser diferentes, traduzindo-se numa separação eficaz.

Em todo este método, passos como a escolha da fase móvel, considerando em particular a sua polaridade, e a escolha da fase estacionária, são fundamentais (Mendham e col, 2002).

### 3 – ENSAIOS EFECTUADOS

#### 3.1 – Caracterização da metodologia analítica usada para a detecção, identificação e quantificação das substâncias em estudo

O desenvolvimento de uma metodologia analítica por LC-MS requer a realização de muito trabalho prévio, passando por três passos fundamentais que são, a preparação da amostra, a separação cromatográfica e a detecção por espectrometria de massa. Inicialmente, procedeu-se à injeção directa no detector de massas (sem passar previamente por qualquer coluna cromatográfica) dos padrões analíticos em estudo (tramadol e amitriptilina) a uma concentração de 10 µg/ml, de forma a determinar os respectivos iões a analisar, que correspondem ao fragmento da molécula, obtido após a ionização por ESI. Com esta injeção directa ficaram definidas as condições do tipo de *electrospray* a aplicar às substâncias, bem como a voltagem ideal para a fragmentação de cada composto.

Depois de definidas as condições de detecção, avançou-se para a definição das condições de separação cromatográfica (tabela 9), como a escolha da fase móvel, da fase estacionária, da velocidade do fluxo, temperatura da coluna, e volume de injeção, que permitissem otimizar a separação e quantificação dos picos correspondentes aos compostos em estudo.

**Tabela 9** – Condições experimentais do sistema LC-MS aferidas para a determinação de tramadol e amitriptilina em amostras de saliva.

Sistema de Cromatografia Líquida (LC)	Detector de Espectrometria de Massa (MS)
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Fase Móvel:</b> Acetonitrilo: Ác. Fórmico 0.1% (90:10, v/v)</li> <li>▪ <b>Fase Estacionária:</b> Coluna de fase reversa Atlantis™ T<sub>3</sub> (2,1x 150 mm; 3 µm), Waters</li> <li>▪ <b>Fluxo:</b> 0,3 ml/minuto (Gradiente)</li> <li>▪ <b>Temperatura da Coluna:</b> 35°C</li> <li>▪ <b>Volume de Injeção:</b> 20 µl</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Ionização:</b> Electrospray positivo</li> <li>▪ <b>Voltagem do capilar:</b> 3,5 kV</li> <li>▪ <b>Voltagem do cone:</b> 35 V</li> <li>▪ <b>Extractor:</b> 5 V</li> <li>▪ <b>Energia do ião:</b> 0,5 V</li> <li>▪ <b>Temperatura da fonte:</b> 70°C</li> <li>▪ <b>Temperatura de dessolvatação:</b> 200°C</li> <li>▪ <b>Fluxo do gás do cone (N<sub>2</sub>):</b> 0 L/hr</li> <li>▪ <b>Fluxo do gás de dessolvatação (N<sub>2</sub>):</b> 500 L/hr</li> </ul>

Na tabela 10 estão descritas as condições utilizadas para a confirmação dos compostos em estudo, tramadol e amitriptilina, no que diz respeito a tempo de retenção, tipo de ionização e SIR (*Selected Ion Recording*).

Para ambas as substâncias, foram determinados três iões, sendo um correspondente ao ião principal (mais abundante) e os outros correspondentes aos iões de confirmação (resultantes da fragmentação das moléculas). No que diz respeito aos padrões internos, foram apenas determinados os iões principais, m/z 268 para o tramadol-d<sub>3</sub> e m/z 290 para o diazepam-d<sub>5</sub>.

Para os padrões internos não foi utilizado nenhum ião de confirmação já que se trata de uma substância adicionada numa concentração previamente conhecida e que, consequentemente, estará presente na amostra a quantificar (caso contrário, concluir-se-ia que a análise não teria sido realizada correctamente, provavelmente no passo da extracção da amostra, com consequente perda do padrão interno).

Ao ser efectuada uma análise a uma amostra biológica, por norma, não se sabe quais as substâncias que podem estar presentes. É por isso muito importante garantir a identificação correcta da substância detectada. Para dar maior credibilidade à identificação do nosso método foram pesquisados, além do ião principal (quantificador), dois iões secundários (de confirmação).

**Tabela 10** – Tempos de retenção, tipo de ionização e SIR específico utilizados.

	Tramadol	Tramadol-d <sub>3</sub>	Amitriptilina	Diazepam-d <sub>5</sub>
<b>Tempo de Retenção (min.)</b>	8,37	8,27	10,89	13,71
<b>Ionização (Electrospray)</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<b>SIR do ião principal</b>	264,13 (CV= 20 V)	268 (CV= 20 V)	278,17 (CV= 25 V)	290 (CV= 25 V)
<b>SIR do ião de confirmação</b>	217,02 (CV= 50 V)	—	218,04 (CV= 60 V)	—
<b>SIR do ião de confirmação</b>	162,00 (CV= 70V)	—	191,04 (CV= 45V)	—

As substâncias foram identificadas com base no seu cromatograma (pico e tempo de retenção) e o respectivo espectro, confirmando a massa ( $m/z$ ) definida para a sua detecção, identificação e confirmação.

Enquanto para o tramadol se verificou que o tempo de retenção foi semelhante ao do seu padrão interno, tal como seria de esperar uma vez que se trata da mesma substância, mas deuterada, já no caso da amitriptilina os tempos de retenção foram ligeiramente diferentes, uma vez que o padrão interno utilizado foi o Diazepam- $d_5$ . Para esta substância não foi possível a utilização do seu padrão deuterado uma vez que não se encontrava, no momento, disponível no mercado.

As figuras 13, 14, 15 e 16 representam os cromatogramas tipo a obter para as substâncias a analisar. Cada padrão foi injectado a uma concentração final de 10  $\mu\text{g/ml}$ .

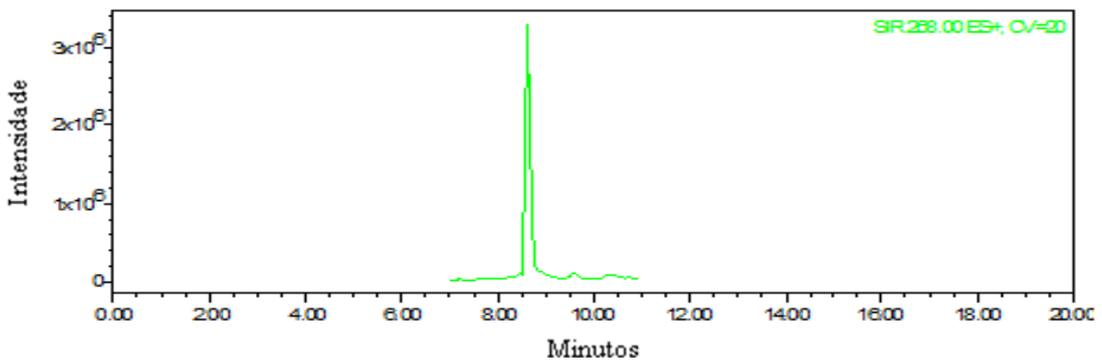


Figura 13 – Cromatograma tipo a obter para o padrão interno tramadol- $d_3$ , Ião principal: 268.

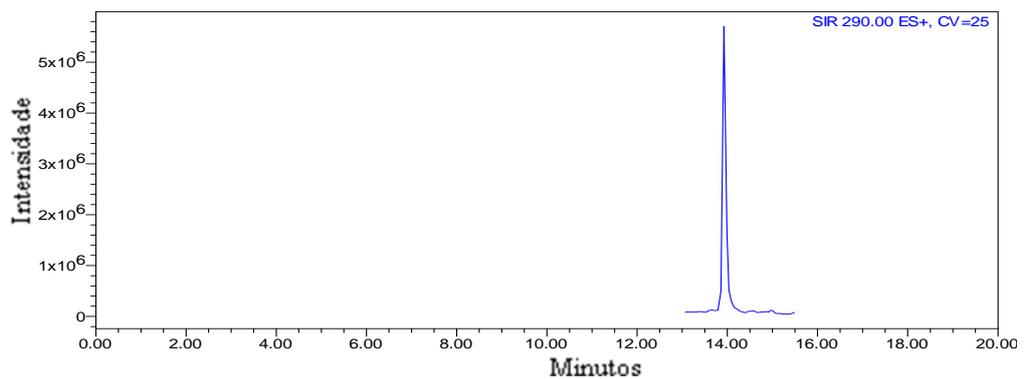


Figura 14 – Cromatograma tipo a obter para o padrão interno diazepam- $d_5$ , Ião principal: 290.

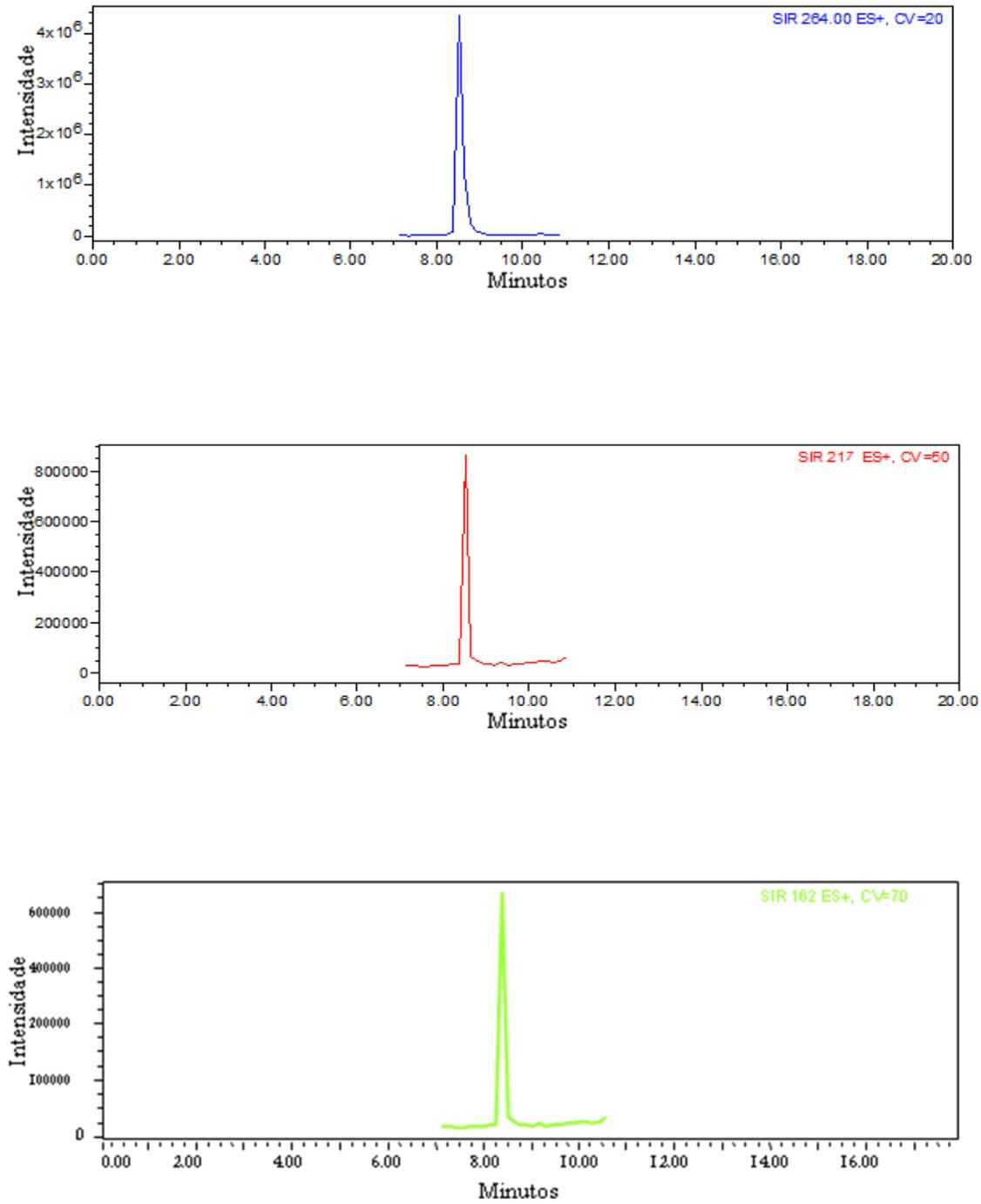


Figura 15 – Cromatograma tipo a obter para o padrão tramadol: A – Ião principal: 264; B – Iões de confirmação: 217 e 162.

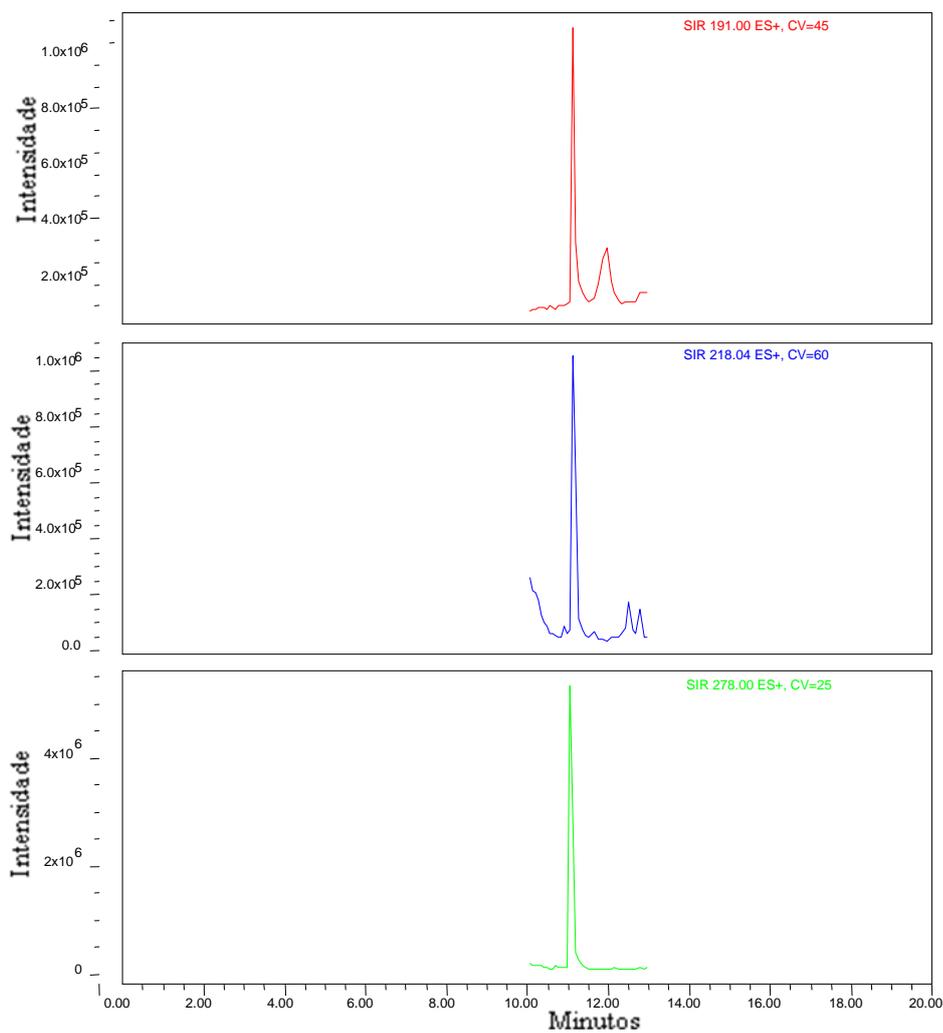


Figura 16 – Cromatograma tipo a obter para o padrão amitriptilina: Ião principal: 278; Iões de confirmação: 191e 218.

### 3.2 – Aplicação das condições analíticas finais aos padrões em fase móvel

Após a definição das condições analíticas do método, procedeu-se ao estudo do comportamento de padrões de tramadol e da amitriptilina em fase móvel, de modo a que se pudesse efectuar a avaliação dos limites de detecção do equipamento, bem como a linearidade obtida.

Na avaliação dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do equipamento foram efectuadas injeções de soluções padrão, em concentrações decrescentes, bem como do respectivo padrão interno. Assim, pudemos avaliar o comportamento do equipamento sem que houvesse a interferência do processo extractivo e da própria amostra biológica.

A preparação destes padrões foi realizada adicionando o volume necessário de cada padrão e perfazendo para 1ml com metanol. Cada tubo foi levado à secura por evaporação sob o fluxo de uma corrente de azoto e, posteriormente, reconstituído com 80 µl de fase móvel, para posterior injeção de 20 µl no sistema cromatográfico.

Assim, após a injeção de concentrações decrescentes de tramadol e de amitriptilina em fase móvel, determinou-se um LOD de 0,65 ng/ml e um LOQ de 1,96 ng/ml para o tramadol e um LOD de 0,54 ng/ml e um LOQ de 1,62 ng/ml para a amitriptilina, correspondendo à mínima concentração capaz de ser detectada por este sistema com as condições definidas.

De seguida, avaliou-se a linearidade do método ainda na fase móvel do sistema cromatográfico. Para tal, foram construídas rectas de calibração para ambas as substâncias em análise em solução na fase móvel do sistema cromatográfico LC/MS [Acetonitrilo: Ácido Fórmico 0,1% (90:10, v/v)], de forma a determinar, desde logo, se teria linearidade, uma vez que este é o requisito fundamental antes de se partir para o estudo em amostras biológicas.

As rectas de calibração foram construídas com concentrações entre 1 ng/ml a 250 ng/ml. Foram preparadas as seguintes concentrações dos referidos compostos (em ng/ml): 1; 2; 5; 10; 25; 50; 100; 150; 200 e 250. Para cada concentração foram preparadas três soluções diferentes tendo sido injectadas cada uma individualmente.

A partir dos valores médios obtidos das três injeções de cada uma das dez concentrações, foi construída a recta de calibração (Figuras 17 e 18). Estas soluções

foram directamente injectadas no sistema de LC/MS, sem sofrer um prévio processo extractivo, tendo sido levadas à secura por evaporação com azoto, reconstituídas com 80 µl de fase móvel e posteriormente injectadas (20 µl) no sistema cromatográfico. As figuras seguintes representam uma das rectas realizadas para cada um dos compostos em estudo.

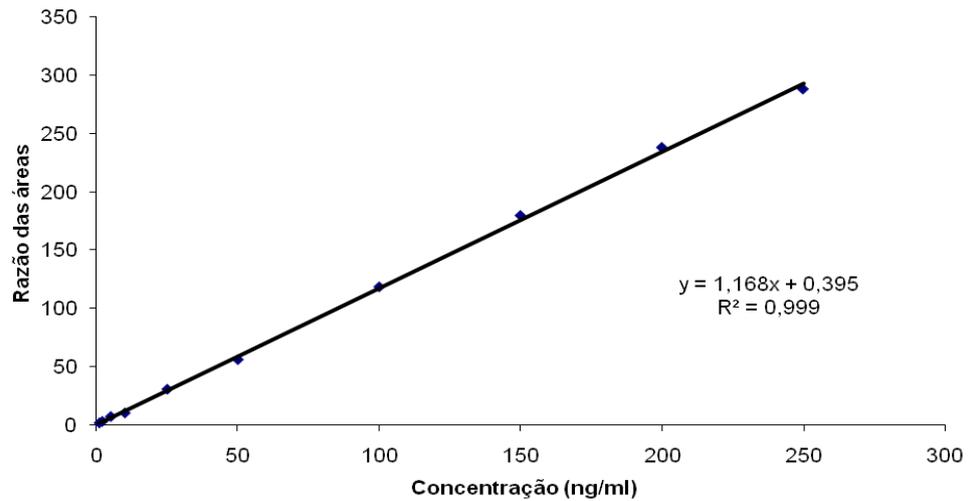


Figura 17 – Recta de calibração para o tramadol na fase móvel do sistema.

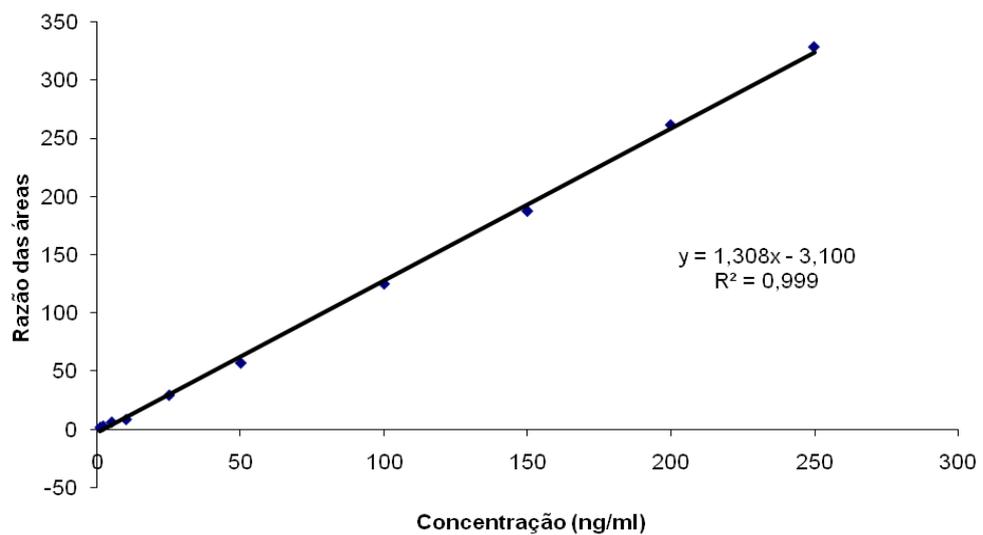


Figura 18 – Recta de calibração para a amitriptilina na fase móvel do sistema.

Os resultados obtidos demonstram que o método cromatográfico desenvolvido apresenta um bom limite de detecção para ambas as substâncias em estudo, tendo-se atingido inclusivamente uma linearidade muito boa, com factores de correlação de 0,999 para o tramadol e para a amitriptilina.

Estes resultados permitiram concluir que o método estava apto a ser aplicado a amostras biológicas, que foi o passo seguinte a realizar.

### 3.3 – Estudo em Saliva

Tal como foi referido anteriormente, foram estudadas e estabelecidas as condições ideais de análise para a amitriptilina e para o tramadol por LC-MS. No entanto, uma vez que as substâncias são determinadas em amostras biológicas, seria então necessário estudar e adaptar as condições alcançadas à amostra biológica a estudar (a saliva), como é requerido para uma adequada validação de um método analítico. Nas páginas seguintes descrevem-se os passos realizados nesse sentido.

#### 3.3.1 – Selecção e Preparação da Amostra Biológica

Os ensaios de validação do método analítico foram realizados recorrendo a amostras brancas de saliva (isentas de compostos), fortificadas com concentrações conhecidas dos compostos em estudo.

As amostras de saliva foram recolhidas através de dispositivos *Saliva Sampler<sup>TM</sup>* (Figura 19), procedendo de acordo com as indicações do fabricante.



**Figura 19** – Dispositivo *Saliva Sampler<sup>TM</sup>* para recolha de saliva.

A embalagem selada do dispositivo contém um tubo de transporte (com líquido tampão) e um dispositivo de recolha inserido numa embalagem estéril. Este dispositivo de recolha é constituído por um algodão ligado a uma pega de plástico. Na extremidade distal da pega de plástico existe uma pequena abertura que permite visualizar a parte terminal do algodão que se encontra embebida num indicador e que se torna azul quando entra em contacto com a saliva. Esta mudança de cor indica que foi recolhida saliva suficiente para proceder ao estudo.

O procedimento de recolha inicia-se colocando a extremidade de algodão na boca, onde deve permanecer até que seja visível a mudança de cor na outra extremidade do colector. Caso não seja verificada qualquer alteração de cor, deve ser retirado da boca ao fim de 5 minutos. Em seguida, o colector é colocado no tubo de transporte e fechado convenientemente.

A reconstituição da saliva é efectuada, primeiramente, retirando parcialmente o colector e forçando a que se separe o respectivo algodão. Em seguida, é utilizado um tubo de filtração que, quando pressionado contra o algodão no fundo do tubo, força a passagem da saliva e do tampão, ficando assim separada do algodão. Transfere-se a saliva para um tubo, acondiciona-se e conserva-se a baixas temperaturas.

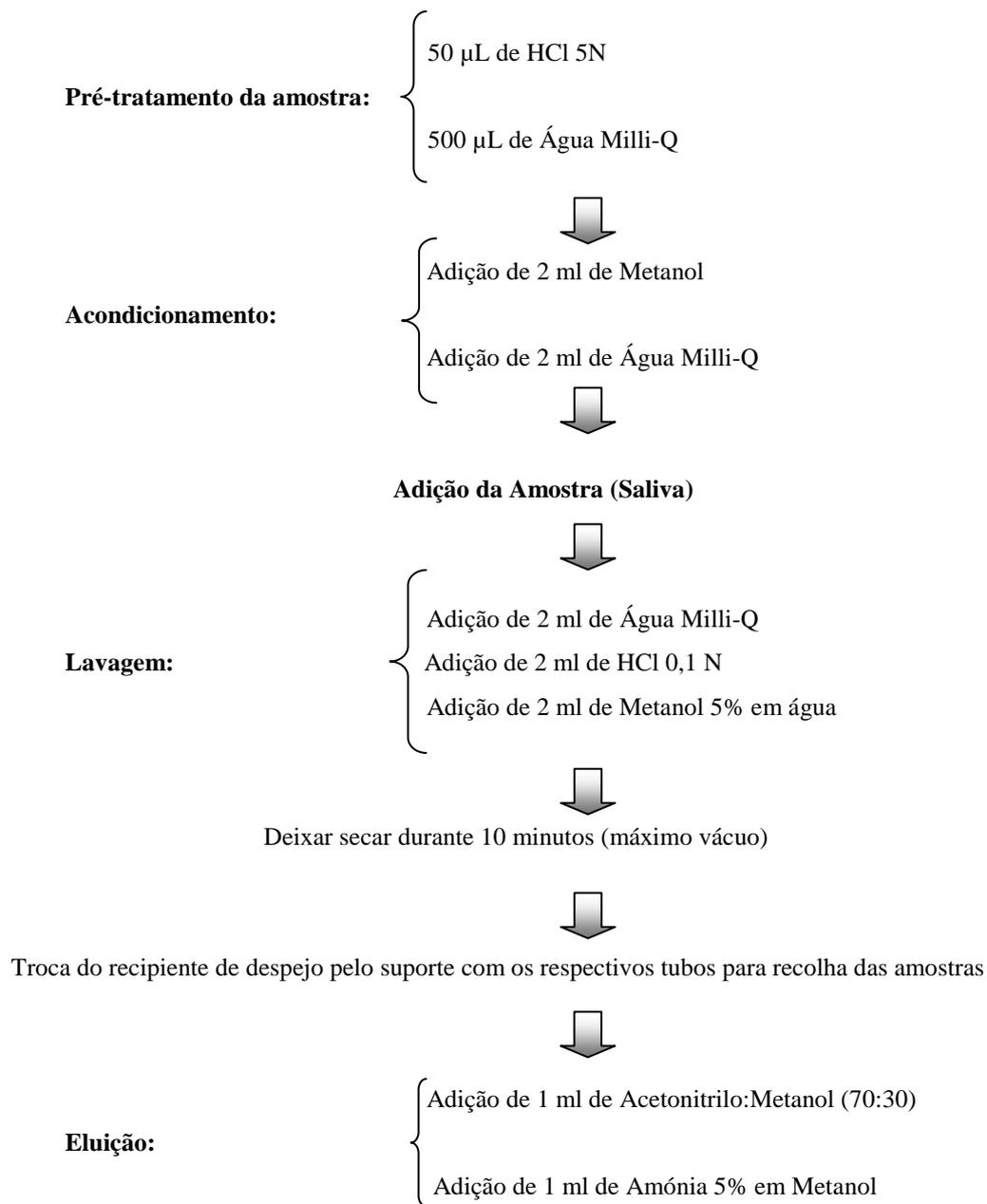
Para proceder à fortificação das amostras, partiu-se de 500 µl de amostra de saliva com tampão, ao qual foram adicionadas as substâncias em estudo (tramadol e amitriptilina).

### **3.3.2 – Extracção dos compostos a partir da saliva por fase sólida**

A extracção é um passo determinante na análise de qualquer substância em investigação toxicológica. É, por norma, um processo complexo que requer técnicas analíticas de extracção específicas para a remoção das substâncias a determinar.

No presente estudo foram utilizadas colunas de extracção de fase sólida Oasis com um meio hidrofílico de troca catiónica (MCX) 3cc (60mg), Waters, para proceder à extracção das amostras de saliva previamente fortificadas. O sistema de

extracção é constituído por um extractor adaptado a estas colunas e acoplado a um sistema de vácuo. Procedeu-se a extracção de acordo com o seguinte esquema:



Os extractos obtidos foram posteriormente levados à secura, sob corrente de azoto, e em banho-maria, a 35°C. Os resíduos secos obtidos foram então reconstituídos em 80 µl da fase móvel e agitados no vórtex para a recuperação completa da amostra. Foram depois colocados em vials e analisados por LC/MS, injectando 20 µl no sistema.

### **3.3.3 – Validação do Método Analítico – Resultados Obtidos**

Tal como já referido, foi seleccionado o método a usar, quer em termos de determinação analítica, quer de preparação das amostras (procedimento extractivo), passando-se de seguida à sua validação, de forma a demonstrar que ele é adequado para a concretização dos objectivos propostos.

Descrevem-se, de seguida, os resultados obtidos para cada parâmetro avaliado, de acordo com os critérios e normas descritos.

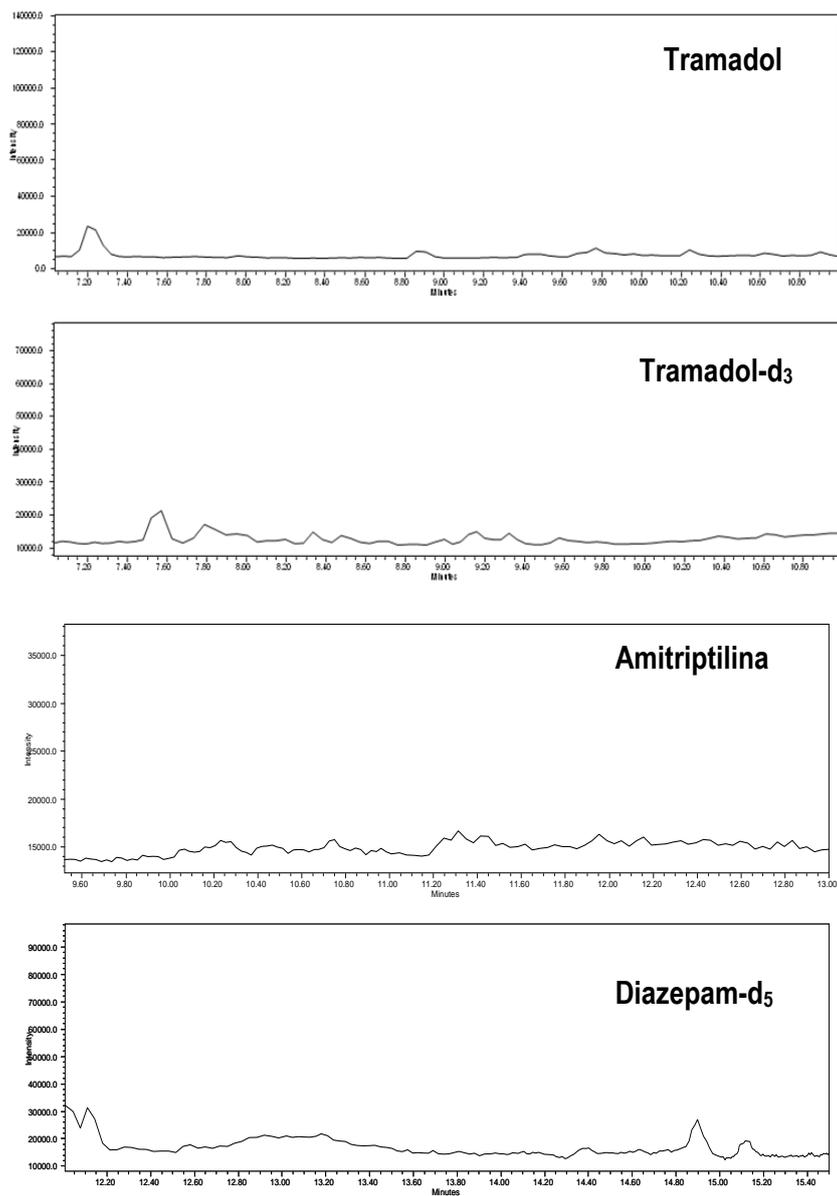
#### **I – ESPECIFICIDADE/SELECTIVIDADE**

A especificidade de um método pode ser determinada através de diferentes processos (Peters e Maurer, 2002). Uma das técnicas usualmente utilizadas é determinação da resposta cromatográfica de uma matriz branca, isenta de qualquer tipo de substâncias. Por norma, são analisadas seis amostras brancas de origens distintas, mas há estudos que consideram que deverão ser analisadas entre 10 a 20 amostras (Dadgar e col., 1995).

Segundo as normas da FDA (2001), quando se procede à pesquisa da selectividade de um método destinado à quantificação de mais do que um analito, esta deve ser avaliada isoladamente para cada um dos analitos, de modo a assegurar a ausência de interferências.

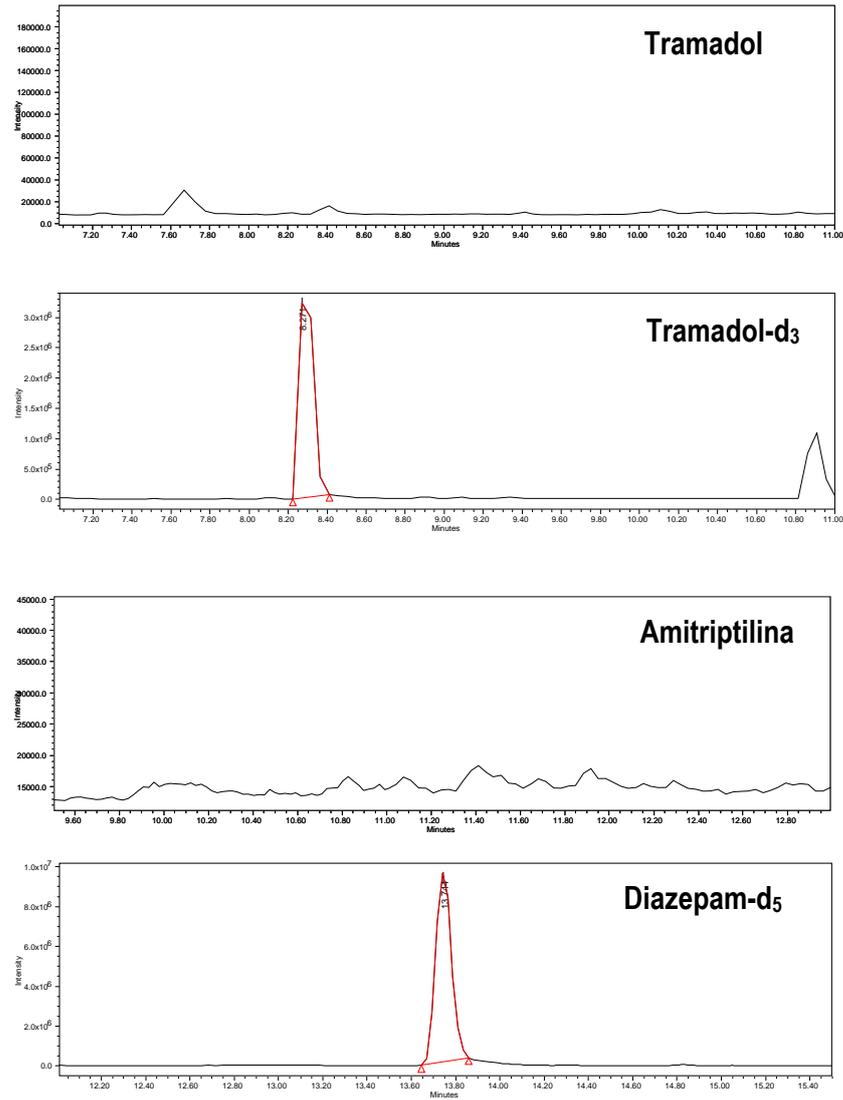
No desenvolvimento do nosso método, a selectividade foi avaliada através da realização de quatro estudos distintos:

No primeiro foram preparadas dez amostras de saliva brancas sem que fosse adicionado qualquer tipo de substância, demonstrando-se que não existiram quaisquer picos no mesmo tempo de retenção dos compostos em estudo (tramadol e amitriptilina), bem como dos padrões internos deuterados (tramadol-d<sub>3</sub> e diazepam-d<sub>5</sub>) (Figura 20).



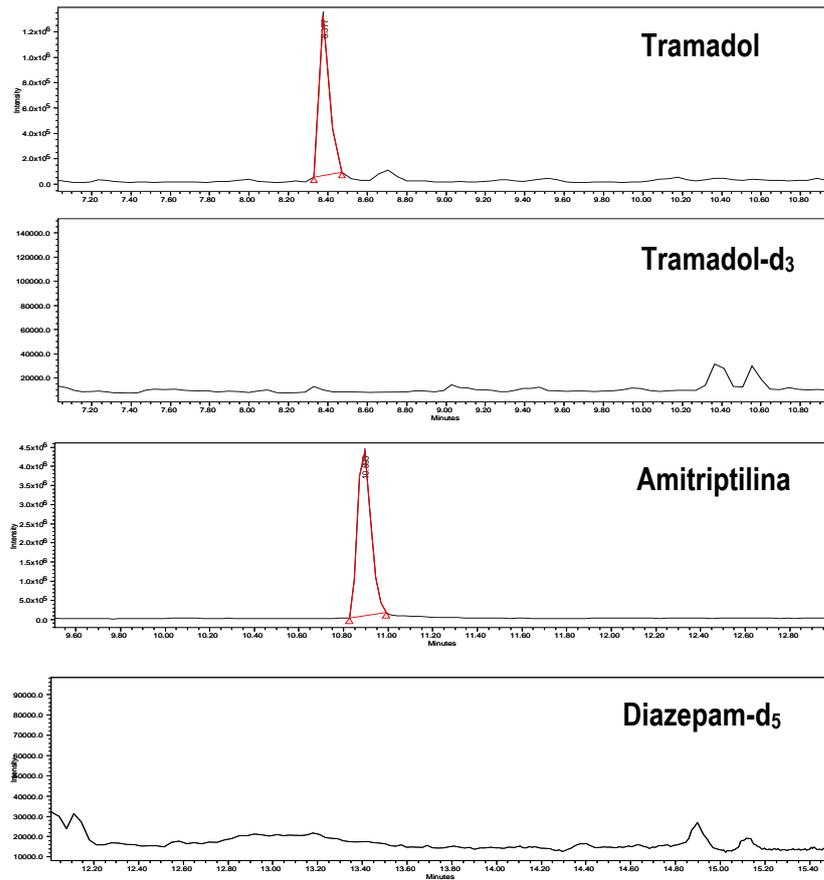
**Figura 20** – Cromatogramas obtidos da análise por LC-MS de salivas brancas.

No segundo ensaio, a dez amostras negativas foi adicionado apenas o respectivo padrão interno analítico, tramadol-d<sub>3</sub> e diazepam-d<sub>5</sub> a 100 ng/ml. Foi apenas detectado o pico correspondente ao padrão interno, o que confirma a ausência de analitos nativos na solução de padrão interno (Figura 21).



**Figura 21** – Cromatogramas obtidos da análise por LC-MS de salivas apenas com adição dos padrões internos tramadol-d<sub>3</sub> e diazepam-d<sub>5</sub>.

No ensaio seguinte foram preparadas dez amostras apenas com as substâncias a determinar (tramadol e amitriptilina), a uma concentração de 25 ng/ml sem adição de qualquer padrão interno. Foi apenas detectado o pico correspondente ao composto em estudo e única substância adicionada à amostra (Figura 22).



**Figura 22** – Cromatogramas obtidos da análise por LC-MS de salivas apenas com adição dos compostos em estudo tramadol e amitriptilina.

Por último foram preparadas dez amostras contendo diversas substâncias, incluindo drogas de abuso e outros medicamentos, de modo a verificar a possível interferência com a análise dos compostos a determinar. Neste último ensaio, adicionou-se Nordazepam, 7-Aminoflunitrazepam, Diazepam, Oxazepam, Zolpidem, Alprazolam, Flunitrazepam, Clonazepam, Lorazepam, Zopiclone, Anfetamina, Metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, Benzoilecgonina (BE), Metadona, Morfina, Codeína, Cocaína e 6-MAM a 25 ng/ml e os compostos em estudo (tramadol e amitriptilina), a 25 ng/ml. Concluímos que nenhum dos 21 compostos testados teve qualquer tipo de interferência no tempo de retenção dos compostos em estudo.

## II – LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO

Na determinação dos limites de detecção do método para as substâncias em estudo, foram fortificadas amostras de saliva com concentrações decrescentes de tramadol e amitriptilina de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 ng/ml.

Foram, assim, construídas rectas de acordo com os resultados obtidos (Tabela 11 e 12), tendo-se obtido limite de detecção de 0,84 ng/ml para o tramadol, e de 1,37 ng/ml para a amitriptilina. Estes valores correspondem à concentração a partir da qual a razão sinal/ruído do ião principal do tramadol e de amitriptilina foi superior a 3.

**Tabela 11** – Resultados obtidos para a determinação dos LOD e LOQ para o tramadol.

LOD e LOQ			
Concentração (ng/ml)	Tramadol	Tramadol-d <sub>3</sub>	A <sub>Tramadol</sub> /A <sub>Pi</sub>
0,5	1666265	5885416	0,283117671
1	2249971	4933388	0,456070111
2	2955969	4604158	0,642021561
3	3700148	4573752	0,808996342
4	4557065	4557909	0,999814834
5	5150833	4443774	1,159112208
6	5678600	4485405	1,26601708
7	1308302	4346824	0,300978786

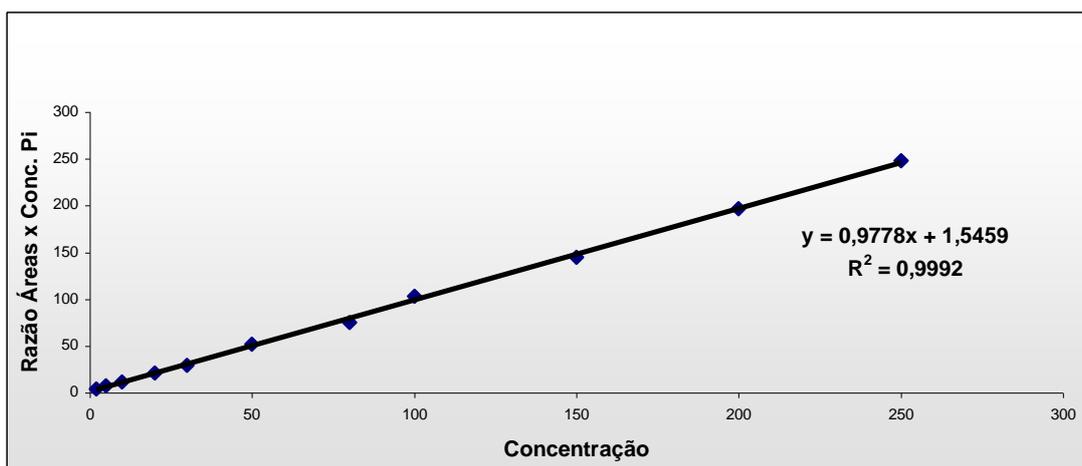
**Tabela 12** – Resultados obtidos para a determinação dos LOD e LOQ para a amitriptilina.

LOD e LOQ			
Concentração (ng/ml)	Amitriptilina	Diazepam-d <sub>5</sub>	A <sub>Amitriptilina</sub> /A <sub>Pi</sub>
0,5	657262	10941892	0,060068368
1	850628	12099940	0,070300156
2	1044568	11379259	0,091795765
3	1264837	12467087	0,101454076
4	1274394	10889779	0,117026603
5	1779388	11053840	0,16097468
6	1732721	9382480	0,18467617
7	1926576	9899476	0,194613971

O limite de quantificação foi determinado a partir das mesmas fortificações, tendo-se alcançado um LOQ de 2,54 ng/ml para o tramadol e de 4,16ng/ml para a amitriptilina. Foram estas as concentrações mínimas destas substâncias que permitiram obter um pico perfeitamente identificável, discreto e reprodutível, apresentando, simultaneamente, uma razão sinal/ruído superior a 10.

### III – LINEARIDADE/RECTA DE CALIBRAÇÃO

A linearidade do método foi avaliada através da fortificação de amostras de saliva com concentrações de tramadol e amitriptilina entre 2 e 250 ng/ml. Foram utilizados onze calibradores para a construção da recta de calibração (2, 5, 10, 20, 30, 50, 80, 100, 150, 200 e 250 ng/ml). Todas as amostras foram processadas de igual forma, no que diz respeito ao método de preparação.

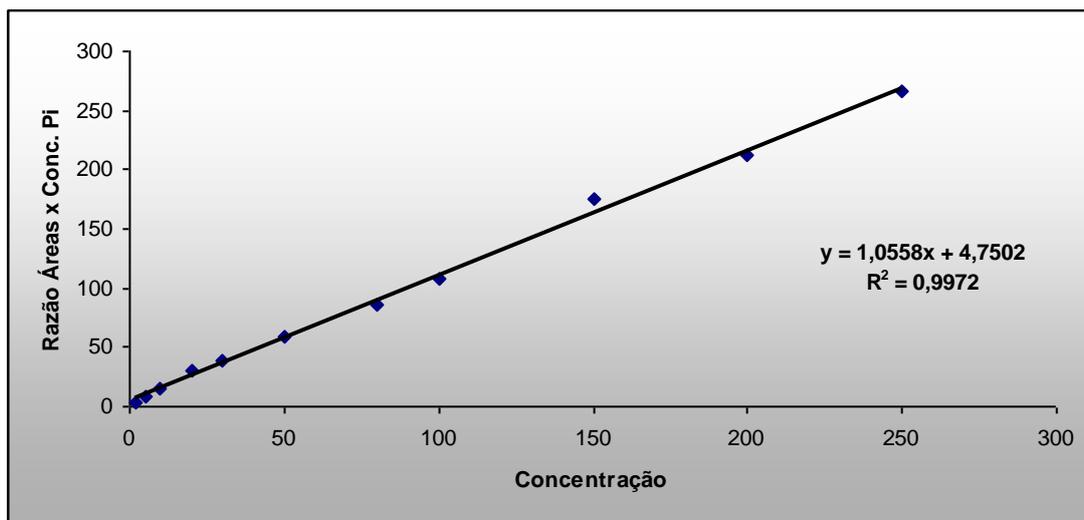


Concentração	Razao das áreas	Razao x Conc. [Pi]
2	0,044122771	4,412277069
5	0,074190814	7,419081356
10	0,117659221	11,76592213
20	0,213489142	21,34891424
30	0,290799845	29,07998446
50	0,517326154	51,73261537
80	0,75145337	75,14533699
100	1,034291554	103,4291554
150	1,450798662	145,0798662
200	1,969895959	196,9895959
250	2,477249846	247,7249846

Figura 23 – Recta de calibração para o tramadol na fase móvel do sistema.

As rectas de calibração foram construídas, tendo por base a razão das áreas dos picos do composto e do seu padrão interno, multiplicado pela concentração do padrão interno *versus* concentração.

Tanto para o tramadol (Figura 23) como para a amitriptilina (Figura 24) foram obtidas linearidades com excelentes coeficientes de correlação, 0,9992 para o tramadol e 0,9972 para a amitriptilina.



Concentração	Razao das áreas	Razao x Conc. [Pi]
2	0,029658339	2,965833921
5	0,079118825	7,911882467
10	0,149353648	14,93536483
20	0,309535535	30,95355351
30	0,380105908	38,0105908
50	0,581467144	58,14671444
80	0,852512244	85,25122437
100	1,079320973	107,9320973
150	1,746534268	174,6534268
200	2,122564407	212,2564407
250	2,66323888	266,323888

Figura 24 – Recta de calibração para a amitriptilina na fase móvel do sistema.

IV – PRECISÃO E EXACTIDÃO

A precisão e exactidão foram avaliadas a partir de amostras de saliva fortificadas com tramadol e amitriptilina a três níveis de concentração, 10, 75 e 200 ng/ml. Foi realizada a avaliação dos coeficientes de variação (CV) num mesmo dia (intra-dia) e em cinco dias consecutivos (inter-dia), após a injeção de três réplicas de cada concentração, através da seguinte equação:

$$CV = \frac{s(dia)}{Concentração\ real} \times 100$$

onde CV corresponde ao coeficiente de variação e  $s(dia)$  corresponde à variação dentro do mesmo dia.

Tendo por base as rectas de calibração obtidas para cada substância foram calculados os valores de precisão (RDS, %) para cada uma das concentrações.

Assim sendo, foram realizadas injeções durante 5 dias (Tabela 13 a 16) quer para o tramadol, quer para a amitriptilina (Tabela 17 a 20), tendo sido os resultados obtidos aplicados de acordo com os esquemas que se intercalam com as respectivas tabelas.

**Tabela 13** – Resultados obtidos para a determinação da precisão intra e inter-dia relativamente ao tramadol, a uma concentração de 10 ng/ml.

Controlo a 10ng/ml	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
Réplica 1	10,03368284	9,599793692	14,28815452	9,080453932	8,84205725
Réplica 2	10,20383924	9,88450835	9,733079969	8,58666405	10,34626696
Réplica 3	10,52780353	9,750729114	9,323347721	8,570569054	9,019254076

Para estimarmos o factor dia usámos a expressão  $\sigma_A^2 = \sigma_0^2 + m \cdot \sigma_{dia}^2 \Rightarrow \sigma_{dia}^2 = \frac{\sigma_A^2 - \sigma_0^2}{m}$

Desta forma, aplicando a referida fórmula, obtivemos os seguintes valores:

$\sigma_A^2 = 2,40$ ;  $\sigma_0^2 = 1,69$  e  $m=3$ , resultando um  $s(dia)$  de 0,49.

Sendo o teor nominal de 10 ng/ml, obtivemos um CV igual a 4,86%.

Tabela 14 – Resultados obtidos para a determinação da precisão intra e inter-dia relativamente ao tramadol, a uma concentração de 75 ng/ml.

Controlo a 75 ng/ml	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
Réplica 1	71,51617051	72,46343874	70,33649087	69,1557143	66,16577388
Réplica 2	69,37542615	74,13078987	85,2771524	67,48034654	71,59134838
Réplica 3	72,62851046	75,05407735	79,58345536	67,02765757	74,07166712

Aplicando a fórmula atrás descrita, obtivemos os seguintes valores:

$$\sigma_A^2 = 47,44; \sigma_0^2 = 15,78 \text{ e } m=3, \text{ resultando um } s(\text{dia}) \text{ de } 3,25.$$

Sendo o teor nominal de 75 ng/ml, obtivemos um CV igual a 4,33%.

Tabela 15 – Resultados obtidos para a determinação da precisão intra e inter-dia relativamente ao tramadol, a uma concentração de 200 ng/ml.

Controlo a 200ng/ml	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
Réplica 1	197,4479266	212,175945	198,0911695	196,1695551	213,7530629
Réplica 2	193,7319357	211,0808605	221,7565838	182,8538101	204,0574838
Réplica 3	197,3610387	210,2146614	224,3272902	180,6652418	234,1696262

Uma vez mais, a este nível de concentração obtivemos os seguintes valores:

$$\sigma_A^2 = 590,43; \sigma_0^2 = 93,21 \text{ e } m=3, \text{ resultando um } s(\text{dia}) \text{ de } 12,87.$$

Sendo o teor nominal de 200 ng/ml, obtivemos um CV igual a 6,44%.

Os dados obtidos, representados na tabela 16, permitem verificar que o estudo da precisão para o tramadol obteve resultados (tanto intra-dia como inter-dia), com coeficientes de correlação muito inferiores a 10%. Para a exactidão do método, os resultados obtidos apresentaram valores entre 96 e 103%.

Tabela 16 – Valores de precisão (intra-dia e inter-dia) e exactidão para o tramadol em saliva.

Concentração	Precisão Intra-dia		Precisão Inter-dia		Exactidão (%)
	Desvio Padrão	C.V. (%)	Desvio Padrão	C.V. (%)	
10 ng/ml	0,14	<b>1,46%</b>	1,37	<b>4,86</b>	<b>98,53</b>
75 ng/ml	1,31	<b>1,78%</b>	4,98	<b>4,33</b>	<b>96,52</b>
200 ng/ml	0,98	<b>0,47%</b>	14,99	<b>6,44</b>	<b>103,01</b>

Realizado o mesmo estudo para a amitriptilina, obtivemos os resultados expressos nas tabelas 17 a 20.

Tabela 17 – Resultados obtidos para a determinação da precisão intra e inter-dia relativamente à amitriptilina, a uma concentração de 10 ng/ml.

Controlo a 10 ng/ml	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
Réplica 1	4,85751504	9,342194203	4,457628224	9,871199221	7,304994005
Réplica 2	5,574457824	4,975010616	6,851425081	6,884396114	7,415223978
Réplica 3	5,708552485	5,49137953	6,4623746	8,548067342	8,457901816

Aplicando a fórmula atrás descrita, obtivemos os seguintes valores:

$\sigma_A^2 = 4,76$ ;  $\sigma_0^2 = 2,04$  e  $m=3$ , resultando um  $s(dia)$  de 0,95.

Sendo o teor nominal de 10 ng/ml, obtivemos um CV igual a 9,53%.

Tabela 18 – Resultados obtidos para a determinação da precisão intra e inter-dia relativamente à amitriptilina, a uma concentração de 75 ng/ml.

Controlo a 75 ng/ml	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
Réplica 1	79,06667501	57,11414768	67,95855017	74,91004798	57,46511459
Réplica 2	71,14197594	70,16801161	77,33121755	76,24222472	67,14277213
Réplica 3	72,41618775	79,81890419	65,60907238	71,95641257	53,27792249

Uma vez mais, a este nível de concentração obtivemos os seguintes valores:

$\sigma_A^2 = 113,14$ ;  $\sigma_0^2 = 48,36$  e  $m=3$ , resultando um  $s(dia)$  de 4,65.

Sendo o teor nominal de 75 ng/ml, obtivemos um CV igual a 6,20%.

**Tabela 19** – Resultados obtidos para a determinação da precisão intra e inter-dia relativamente à amitriptilina, a uma concentração de 200 ng/ml.

Controlo a 200ng/ml	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
Réplica 1	182,0392599	182,7778945	160,175454	177,8780469	112,9706605
Réplica 2	166,0983277	163,0666929	133,7163469	169,2506583	115,8964974
Réplica 3	158,0939385	172,8440466	175,7350979	173,0039545	91,54702964

Finalmente, a 200 ng/ml obtivemos os seguintes valores:

$\sigma_A^2 = 2377,35$ ;  $\sigma_0^2 = 178,49$  e  $m=3$ , resultando um  $s(dia)$  de 27,07.

Sendo o teor nominal de 200 ng/ml, obtivemos um CV igual a 13,54%.

Os dados obtidos, representados na tabela 20, permitem verificar que o estudo da precisão para a amitriptilina obteve resultados com coeficientes de correlação inferiores a 10%, à excepção do maior nível de concentração, 200 ng/ml. No entanto, o valor obtido para esta concentração foi inferior a 15%. Para a exactidão do método, os resultados obtidos apresentaram valores entre 68 e 92%.

**Tabela 20** – Valores de precisão (intra-dia e inter-dia) e exactidão para o tramadol em saliva.

Concentração	Precisão Intra-dia		Precisão Inter-dia		Exactidão (%)
	Desvio Padrão	C.V. (%)	Desvio Padrão	C.V. (%)	
10 ng/ml	1,50	<b>17,74%</b>	1,68	<b>9,53</b>	<b>68,13</b>
75 ng/ml	2,19	<b>2,95%</b>	8,18	<b>6,20</b>	<b>92,59</b>
200 ng/ml	4,33	<b>2,50%</b>	28,40	<b>13,54</b>	<b>77,84</b>

V – RECUPERAÇÃO

Este parâmetro foi avaliado a partir de amostras fortificadas a 3 níveis de concentração (10, 100 e 250 ng/ml), antes e após o processo extractivo, com cinco réplicas para cada concentração. A eficiência da extracção foi determinada por comparação das respectivas áreas dos picos dos compostos adicionados às amostras antes da respectiva extracção com as áreas dos mesmos compostos adicionados ao extracto, ou seja, depois da extracção, nos mesmos níveis de concentração, tendo-se obtido valores de recuperação entre 66 e 90%, para o tramadol e entre 67 e 92% para a amitriptilina (Tabela 21).

**Tabela 21** – Valores de recuperação obtidos a 3 níveis de concentração para o tramadol e para a amitriptilina, em saliva.

<b>% de Recuperação do método</b>							
<b>10 ng/ml</b>							
	<b>Réplica 1</b>	<b>Réplica 2</b>	<b>Réplica 3</b>	<b>Réplica 4</b>	<b>Réplica 5</b>	<b>Média</b>	
<b>Tramadol</b>	95,58594309	51,29502746	72,42318898	54,27005942	57,42763215	<b>66,20037</b>	<b>66%</b>
<b>Amitriptilina</b>	69,56116484	95,5811242	80,07723359	38,50696129	49,79216455	<b>66,70373</b>	<b>67%</b>
<b>100 ng/ml</b>							
	<b>Réplica 1</b>	<b>Réplica 2</b>	<b>Réplica 3</b>	<b>Réplica 4</b>	<b>Réplica 5</b>	<b>Média</b>	
<b>Tramadol</b>	83,11648486	93,02357868	90,898571	100,7533907	80,17070831	<b>89,59255</b>	<b>90%</b>
<b>Amitriptilina</b>	113,2151401	97,04853625	94,76725724	86,01521298	69,7497044	<b>92,15917</b>	<b>92%</b>
<b>250 ng/ml</b>							
	<b>Réplica 1</b>	<b>Réplica 2</b>	<b>Réplica 3</b>	<b>Réplica 4</b>	<b>Réplica 5</b>	<b>Média</b>	
<b>Tramadol</b>	96,42703383	73,40420438	74,514045	58,2733982	58,29934971	<b>72,18361</b>	<b>72%</b>
<b>Amitriptilina</b>	96,37400225	82,65651558	68,81904531	85,57358772	82,05395874	<b>83,09542</b>	<b>83%</b>

# Parte III

## *Capítulo III*

*Aplicação do Método Analítico  
Validado em Saliva a Amostras  
de Casos Reais - DRUID*



## 1 – INTRODUÇÃO

No capítulo anterior foi desenvolvido um método analítico por LC-MS para a determinação em saliva, com exactidão, precisão e sensibilidade, das substâncias psicotrópicas tramadol e amitriptilina. Neste método podemos salientar o facto de utilizar apenas 500 µl de amostra e de se revelar sensível para a quantificação de tramadol, para concentrações na ordem dos 2,5 ng/ml, e de amitriptilina, para concentrações na ordem dos 4 ng/ml.

De modo a avaliar a possível aplicação corrente do método, foi desenvolvido um estudo com casos reais, designadamente em condutores voluntários. Em relação a estes voluntários só tínhamos a informação por eles fornecida no questionário, ou seja, a recolha de saliva foi feita, utilizando os dispositivos *Saliva Sampler*<sup>TM</sup>, independentemente da referência ao consumo de amitriptilina ou tramadol.

Note-se que, apesar do objectivo principal que levou ao desenvolvimento da metodologia apresentada ser a sua aplicabilidade no projecto DRUID, na prática, para esta dissertação apenas foi possível a análise de um menor número de amostras uma vez que não nos é autorizada a divulgação de qualquer tipo resultado, no âmbito do projecto, antes da sua oficial publicação final, que se prevê para 2010.

Assim sendo, seleccionamos alguns dos controlos previstos para a zona centro, onde foram recolhidas, adicionalmente, amostras, única e exclusivamente para esta dissertação.

## 2 – MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 – Caracterização dos indivíduos voluntários envolvidos no estudo

Foram abordados 35 condutores aleatoriamente, tendo todos eles aceitado participar no estudo, sendo 23 do sexo masculino (com idades compreendidas entre os 18 e os 70 anos) e os restantes do sexo feminino (com idades compreendidas entre os 21 e os 57 anos), (Tabela 22).

Apesar de terem sido interpelados condutores que haviam consumido medicamentos, infelizmente nenhum deles afirmou consumir medicamentos que na sua composição contivessem as substâncias em estudo. Todo o estudo foi realizado em consonância com os requisitos exigidos para este tipo de colheitas em humanos. Assim, cada voluntário leu um documento relativo ao consentimento informado, onde constava detalhadamente a total definição e explicação do âmbito do estudo, os objectivos da investigação proposta, bem como a completa protecção da identidade dos mesmos. Foi igualmente elaborado um pequeno inquérito, destinado a avaliar alguns parâmetros interpretativos no âmbito do trabalho de investigação a realizar.

**Tabela 22** – Caracterização dos indivíduos voluntários envolvidos no estudo.

Voluntário	Sexo	Idade	Medicamentos	Grupo Terapêutico	Amitriptilina ou Tramadol
1	M	27	Não	-	Não
2	M	26	Não	-	Não
3	M	36	Sim	Anticoagulante	Não
4	F	21	Não	-	Não
5	M	28	Não	-	Não
6	M	18	Não	-	Não
7	M	21	Não	-	Não
8	M	23	Sim	Insulina	Não
9	M	31	Não	-	Não
10	M	24	Não	-	Não

**Tabela 22** – Caracterização dos indivíduos voluntários envolvidos no estudo (continuação).

Voluntário	Sexo	Idade	Medicamentos	Grupo Terapêutico	Amitriptilina ou Tramadol
11	M	45	Não	-	Não
12	F	27	Sim	Antibiótico	Não
13	M	49	Sim	Glucocorticoide	Não
14	F	38	Não	-	Não
15	F	24	Sim	Antihistamínico	Não
16	F	31	Não	-	Não
17	F	44	Não	-	Não
18	F	23	Não	-	Não
19	F	23	Sim	Analgésico/ Antipirético + Antihistamínico	Não
20	M	28	Não	-	Não
21	M	29	Não	-	Não
22	F	30	Não	-	Não
23	M	27	Não	-	Não
24	F	57	Sim	Antidiabético Oral; Antidislipidémico; Antihipertensor	Não
25	M	63	Sim	Inibidor de retenção urinária; Sedativo	Não
26	M	60	Sim	Antidislipidémico; Antihipertensor; Anticoagulante; Tratamento da gota; Protector da mucosa gástrica	Não
27	M	31	Não	-	Não
28	M	47	Não	-	Não
29	M	70	Sim	Vasodilatador; Antidepressivo	Não

**Tabela 22** – Caracterização dos indivíduos voluntários envolvidos no estudo (continuação).

Voluntário	Sexo	Idade	Medicamentos	Grupo Terapêutico	Amitriptilina ou Tramadol
30	F	48	Não	-	Não
31	M	50	Não	-	Não
32	M	44	Não	-	Não
33	M	20	Sim	Regulador da secreção gástrica	Não
34	M	46	Não	-	Não
35	F	44	Sim	Sedativo	Não

## 2.2 – Colheita das Amostras

As amostras foram recolhidas em dois controlos rodoviários distintos, em horários compreendidos entre as 4 e as 10 horas e entre as 22 e as 4 horas.

Na prática, os condutores submetidos a paragem pelos agentes da autoridade e que concordavam colaborar foram, desde logo, informados de que:

- 1º. A participação neste estudo era voluntária e realizada sob total anonimato, não havendo registo de nome, número de bilhete de identidade ou qualquer outra informação que pudesse revelar a identidade do condutor.
- 2º. Toda a informação recolhida seria guardada no Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P. durante o projecto e que as amostras de saliva recolhidas serão destruídas após a conclusão do processo analítico.



**Figura 25** – Participação nos controlos rodoviários em conjunto com a GNR e PSP.

De seguida, era solicitado ao voluntário que retivesse o dispositivo de recolha na boca durante, aproximadamente, 5 minutos e que respondesse a um pequeno questionário. Posteriormente o voluntário era encaminhado para uma agente de autoridade, a fim de realizar a determinação da Taxa de Álcool em ar expirado. A amostra de saliva recolhida era depois transportada para o STF para ser analisada.

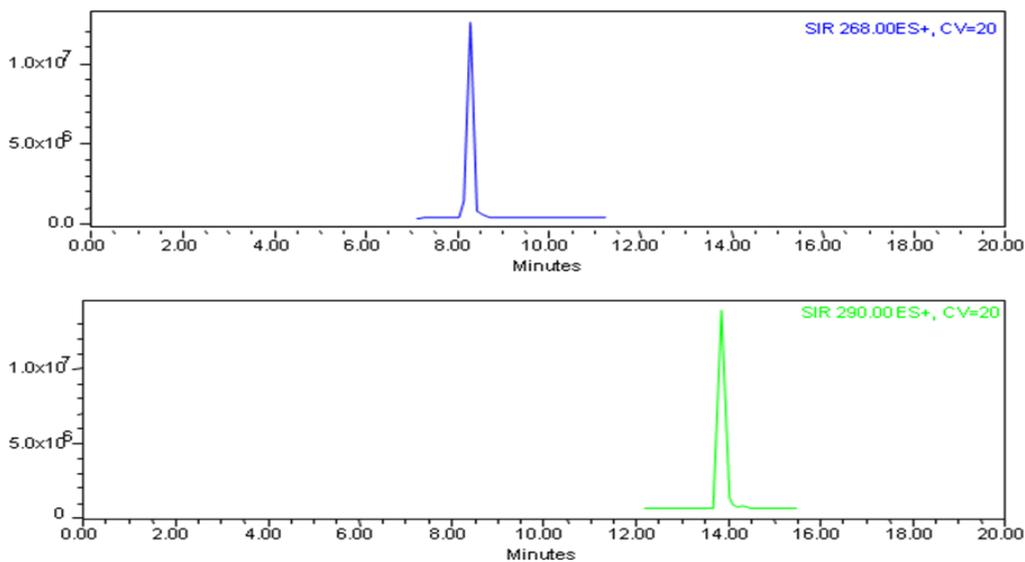
A recolha da amostra de saliva foi realizada através do dispositivo *Saliva Sampler*<sup>TM</sup>, tal como referido no capítulo II desta parte III. Foi pedido aos condutores que colocassem a parte absorvente do dispositivo no interior da boca e que a embebessem em saliva até que, na janela indicadora, aparecesse uma coloração azul (quantidade de saliva suficiente) (Figura 25).

Depois de recolhidas e numeradas, as amostras foram transportadas para o INML, I.P. – Delegação do Centro, onde foi feita a extracção da saliva do dispositivo para pequenos tubos que foram armazenados a baixas temperaturas (-18°C) até serem processadas, tal como foi descrito no capítulo anterior.

### 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tal como seria de esperar, acreditando na veracidade das respostas ao inquérito realizados aos voluntários, todas as 35 amostras revelaram resultados negativos para as substâncias testadas, tramadol e amitriptilina.

A figura seguinte representa uma das amostras analisadas, onde apenas se determinou os padrões internos (tramadol-d<sub>3</sub> e diazepam-d<sub>5</sub>).



**Figura 26** – Espectro dos padrões internos de tramadol-d<sub>3</sub> e de diazepam-d<sub>5</sub>.

Desta forma foi possível concluir, dadas as áreas obtidas para os padrões internos, que as amostras foram todas negativas, sem qualquer tipo de possibilidade de perda de composto e eventual falsa negatividade.

Infelizmente faz parte de todo o estudo aleatório a imprevisibilidade dos resultados e, tal como no nosso caso, ausência dos compostos pretendidos. No entanto, o objectivo foi cumprido, uma vez que o método se revelou eficaz quando aplicado a condições reais.

# Parte III

## *Capítulo IV*

*Discussão dos Resultados e  
Conclusões*



## 1 – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

Nos capítulos anteriores procurou-se desenvolver e posteriormente validar uma metodologia por LC-MS, com prévia preparação das amostras por uma extracção em fase sólida, para a determinação dos compostos activos, tramadol e amitriptilina, em amostras de saliva. Tal como referido anteriormente, os compostos em estudo foram unicamente o tramadol e amitriptilina, já que, no âmbito do projecto DRUID surgiu a possibilidade da inclusão de substâncias adicionais, de acordo com decisão própria de cada país. Assim sendo, em Portugal foi decidido adicionar a amitriptilina e o tramadol em virtude de pertencerem ao grupo de substâncias mais consumido no nosso país, podendo afectar claramente as capacidades cognitivas e psicomotoras de um indivíduo, incompatíveis com uma condução segura.

Esta foi a primeira etapa de toda a parte experimental em virtude de, entre outras razões, ser importante desenvolver um método não existente no Serviço de Toxicologia Forense. Isto é, visou-se, por um lado, demonstrar a importância da investigação de uma amostra biológica alternativa, capaz de resolver muitos aspectos práticos da fiscalização da condução rodoviária sob influência de medicamentos psicotrópicos; por outro lado, desenvolver uma metodologia mais sensível, específica e pouco morosa.

Com efeito, e tal como concluído por alguns autores (Fucci e col., 2003), as análises toxicológicas em amostras de saliva podem ser extraordinariamente importantes para a investigação da existência de um consumo recente, mas devido ao escasso volume disponível, será importante a escolha de uma metodologia que utilize pequenas quantidades de amostra e que demonstre ser claramente sensível.

Efectivamente, o método provou ser específico e selectivo com a utilização de um volume de amostra reduzido (500 µl), sem interferentes da matriz nem a presença de picos que pudessem co-eluir com o composto em estudo, com consequente ausência de efeito de supressão iónica, problemática frequentemente discutida quando se trabalha em LC-MS, uma vez que pode influenciar os resultados, em termos de exactidão, de diferentes análises realizadas pelo mesmo método cromatográfico. Note-se que foram testadas 21 substâncias diferentes, incluindo

diferentes classes de medicamentos e drogas de abuso sem qualquer tipo de interferência com os compostos estudados.

O método cromatográfico descrito apresentou um “tempo de corrida” de 20 minutos, com a correspondente detecção do tramadol a um tempo de retenção de 8,37 minutos e da amitriptilina a um tempo de retenção de 10,89 minutos, representando, assim uma metodologia rápida.

A metodologia de extração desenvolvida e validada apresentou muito bons resultados de recuperação das substâncias em estudo para os três níveis de concentração estudados (10, 100, 250 ng/ml) (entre 66 e 92%), com elevada precisão e exactidão.

Inclusivamente, apresentou a enorme vantagem de se quantificarem, com exactidão e precisão, concentrações muito reduzidas, quer de tramadol (2,54 ng/ml), quer de amitriptilina (4,16 ng/ml), cumprindo uma linearidade para a gama de trabalho proposta, com coeficientes de correlação de 0,999, para ambos os compostos. Na verdade, este método apresentou muito bons limites de detecção e de quantificação para o tramadol (de 0,84 e 2,54 ng/ml, respectivamente) e para a amitriptilina (1,37 e 4,16 ng/ml respectivamente), sendo assim capaz de determinar reduzidas concentrações, frequentemente encontradas nesta amostra biológica.

De acordo com os critérios de validação adoptados, a precisão calculada para cada nível de concentração não deve exceder os 15% do coeficiente de variação (CV), excepto para o LOQ, que não deve exceder 20% do CV. Desta forma, os resultados obtidos demonstram claramente que o método é preciso para o tramadol (tanto intra-dia como inter-dia), com excelentes coeficientes de variação (inferiores a 6%), e exacto, com valores entre 96 e 103%. Também para a amitriptilina, o método foi preciso [tanto intra (excepto para a menor concentração) como inter-dia] com todos os CV inferiores a 15% excepto, tal como referido no estudo intra-dia para a menor concentração, mas não reproduzido nem reflectido no estudo inter-dia e por isso pouco significativo. No entanto, o método teve menores valores de exactidão, uma vez mais para baixas concentrações.

O acoplamento de um detector de espectrometria de massa a um sistema de separação cromatográfica permitiu a resolução, com suficiente garantia, dos problemas de identificação e de quantificação das substâncias, neste caso do tramadol e da amitriptilina, habitualmente presentes aos toxicologistas. Com efeito, a

operação do detector de massas em modo SIR proporcionou uma excelente sensibilidade com uma elevada especificidade, possibilitando a correspondente análise quantitativa.

Para além de ser claro que a LC-MS é uma técnica adequada para a análise de substâncias polares, de elevado peso molecular e de substâncias termolábeis, ultrapassando algumas das limitações observadas com a GC-MS, acima de tudo o nosso trabalho demonstrou ser capaz de alcançar excelentes resultados do ponto de vista analítico para detecção e quantificação de reduzidas concentrações de tramadol e amitriptilina.

Assim, este método poderá ser de grande utilidade no desenvolvimento de estudos comparativos entre dispositivos comerciais existentes para a determinação de medicamentos e drogas de abuso em saliva, *in situ*, recentemente aplicados no nosso país no âmbito do controlo rodoviário.

Em suma, podemos concluir que:

- O método desenvolvido e validado, por LC-MS, para a detecção, identificação, confirmação e quantificação de tramadol e amitriptilina em saliva provou ser específico e sensível, com elevados valores de precisão e exactidão e muito bons limites de detecção e de quantificação tanto para o tramadol (de 0,84 e 2,54 ng/ml, respectivamente), como para a amitriptilina (1,37 e 4,16 ng/ml respectivamente).
- Este método poderá assim, ser uma excelente opção em alternativa à utilização da cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS) já que permite quantificar, com exactidão e precisão, concentrações muito reduzidas de tramadol e de amitriptilina.
- Esta metodologia demonstrou ser pouco morosa, ultrapassando algumas desvantagens das metodologias por GC-MS. Acresce ainda que o método provou ser selectivo e sensível para um reduzido volume de amostra (500 µl), o que constitui uma vantagem inequívoca para a realização de análises toxicológicas em saliva.

- A recuperação do método extractivo utilizado apresentou bons resultados, para os compostos em estudo, com percentagens entre 66 e 92%.

- Em conclusão, a metodologia aqui desenvolvida e validada permitirá a determinação, em simultâneo e com uma única metodologia cromatográfica, de tramadol e de amitriptilina em saliva. Como técnica de elevado potencial em toxicologia forense, poderá vir a ser aplicada no Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P.

# Parte IV

## *Referências Bibliográficas*



## A

**Álvarez FJ, Río MC**, Medicinal Drugs and driving: from research to clinical practice. *Trends in Pharmacological Sciences*. **2002**; 23(9):441-43

**American Pain Society**, Definitions related to the use of opioids in the treatment of pain.  
[<http://www.ampainsoc.org/advocacy/opioids2.htm>], acesso em 19/08/2009.

**American Psychiatric Association**, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 3<sup>rd</sup> Edition. Washington, **1980**;

**Anderson IM**, Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a meta-analysis of efficacy and tolerability. *J Affect Disord*. **2000**; 58:19-36.

**Arpino PJ, Baldwin MA, McLafferty FW**, Liquid chromatography/mass spectrometry. II. Continuous monitoring. *Biomed Mass Spectrom*. **1974**; 1:80-82.

**Autoridade Nacional de Segurança Rodoviária (ANSR)**, Observatório de

segurança rodoviária. *Sinistralidade Rodoviária*. **2006**.

**Autoridade Nacional de Segurança Rodoviária (ANSR)**, Observatório de segurança rodoviária. *Sinistralidade Rodoviária*. **2007**.

**Autoridade Nacional de Segurança Rodoviária (ANSR)**, Observatório de segurança rodoviária. *Sinistralidade Rodoviária*. **2008**.

**Ayd FJ**, Recognizing the depressed patient. *Grune and Stratton*, New York, **1961**.

## B

**Bachs LC, Bramness JG, England A, Skurtveit S**, Repeated dispensing of codein is associated with high consumption of benzodiazepines. *Norwegian J Epidemiol*. **2008**; 18:185-190.

**Bachs LC, England A, Morland JG, Skurtveit S**, The risk of motor vehicle accidents involving drivers with prescriptions for codein or tramadol. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. **2009**; 85(6):596-99.

**Baldessarini e col., 1999.** Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. *Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 9ª edição.* 459-489; Mc Graw-Hill.

**Baldessarini e col., 2001.** Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. *Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 9ª edição.* 459-489; Mc Graw-Hill.

**Baldwin D, Thomson C,** The future of antidepressant pharmacotherapy. *World Psychiatry.* **2003;** 2(1):3-8.

**Bambridge TA, Langford RM,** Tramadol Hydrochloride: An overview of current use. *Hosp Med.* **1998;** 59: 373-376

**Barbone F e col.,** Association of road-traffic accidents with benzodiazepine use. *Lancet.* **1998;** 352:1331-1335.

**Barth H, Giertz H, Schmal A, Lorenz W,** Anaphylactoid reactions and histamine release do not occur after application of the opioid tramadol. *Agents Actions.* **1987;** 20:310-13

**Baselt RC,** Drug effects on psychomotor performance. *Biomedical Publications.* Foster City, CA, **2001.**

**Berridge V, Rawson NSB,** Opiate use and legislative control: a nineteenth century case study. *Social Science and Medicine,* **1979;** 13A(3): 351-363.

**Berridge V e Edwards G,** Opium and the people. *Allan Lane, London,* **1981.**

**Berridge V,** Opium. *Polak, F. & Miks, T.: Dokters en dope. NIAD,* **1994.**

**Bertram U, Kragh-Sorensen P, Rafaelsen O, Larsen NE,** Saliva secretion following long-term antidepressant treatment with nortriptyline controlled by plasma levels. *Scand J Dent Res.* **1979;** 890:357-363.

**Bianchi M, Bondiolotti GP, Ferrario P, Panerai AE,** Interazione tramadolo e antidepressivi sul metabolismo cerebrale della serotonina. XXXIX Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia. 20-23 giugno **1999;** Firenze, Italy.

**Budd K,** Chronic pain – challenge and response. *Drugs.* **1994;** 47(Suppl1):33-38.

**Burch JE, Hullin RP**, Amitriptyline pharmacokinetics. A crossover study with single doses of amitriptyline and nortriptyline. *Psychopharmacology*. **1981**; 74:35-42.

**Biggs SR, Chasseaud LF, Hawkins DR, Midgley I**, Determination of amitriptyline and its major metabolites in human urine by high-performance liquid chromatography. *Drug Metab Dispos*. **1979**; 7:233-36.

**Breyer-Pfaff**, The metabolic fate of amitriptyline, nortriptyline and amitriptyline oxide in man. *Drug Metab Rev*. **2004**; 36:723-46.

**Brodie BB**, Physicochemical and biochemical aspects of pharmacology. *JAMA*. **1967**; 202:600-09.

**Brown CC**, The parotid puzzle: a review of the literature on human salivation and its application to psychophysiology. *Psychophysiology*. **1970**; 7:66-85.

**Bruins AP, Covey TR, Henion JD**, Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Anal Chem*. **1986**; 59:2642-46.

**Buhrman DL, Price PI, Rudewisz PJ**, quantification of sr27417 in

human plasma using electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a study of ion suppression. *J Am Soc Mass Spectrom*. **1996**; 7:1099-1105.

**Burch JE, Hullin RP**, Amitriptyline pharmacokinetics: a crossover study with single doses of amitriptyline and nortriptyline. *Psychopharmacology*. **1981**; 74:35-42.

**Burch JE, Herries DG**, The demethylation of amitriptyline by oral and intramuscular routes. *Psychopharmacology*. **1983**; 80:249-53.

**Burke e Preskorn, 1995**, Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. *Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 9ª edição*. 459-489; McGraw-Hill.

## C

**Caplan YH, Goldberger BA**, Alternative specimens for workplace drug testing. *J Anal Toxicol*. **2001**; 25:396-99.

**Carvalho F**, Condução sob a influência de álcool ou de substâncias psicotrópicas. *Medicina e Saúde*. **2007**; 21:37-39.

**Castro A, Concheiro M, Quintela O, Cruz A, Lopez-Rivadulla M**, LC/MS/MS method for determination of nine antidepressants and some of their metabolites in oral fluid and plasma. Study of correlation between venlafaxine concentrations in both matrices. *J Pharma Bio Anal*. **2008**; 48:183-193.

**Catterson e col., 1997**, Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. *Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 9ª edição. 459-489; Mc Graw-Hill.

**Chaput Y., Montigny C, Blier P**, Presynaptic and postsynaptic modifications of the serotonin system by long-term administration of antidepressant treatments. *An in vivo electrophysiologic study in the rat Neuropsychopharmacology*. 1991; 54:219.

**Cech NB, Enke CG**, Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrom Rev*. **2001**; 20:362-87.

**Christopher TA, Zeccardi JA**, Evaluation of the Q.E.D. Saliva Alcohol Test: a new, rapid, accurate device for measuring ethanol in saliva. *Ann Emerg Med*. **1992**; 21:1135-37.

**Choo RE, Huestis MA**, Oral fluid as a diagnostic tool. *Clin Chem Lab Med*. **2004**; 42:1273-87.

**Chust RB**, Introdução à cromatográfica de líquidos (HPLC). Boletim SPQ. **1990**; 39:43-53.

**Clemmesen L**, Anticholinergic side-effects of antidepressants: studies of the inhibition of salivation. *Acta Psychiatr Scand*. **1988**; 78:90-93.

**CNSforum 2005**, [http://www.cnsforum.com/imagebank/section/Antidepressants/default.aspx]

**Código da Estrada, 2005 (CE)**, aprovado pelo Decreto-Lei nº 44/2005. Diário da República, 1ª série-A, Nº 38, 23 de Fevereiro de 2005.

**Cone EJ**, Saliva testing for drugs of abuse. *Ann NY Acad Sci*. **1993**; 694:91-127.

**Cone EJ, Hillsgrove M, Darwin WD**, Simultaneous measurement of cocaine, cocaethylene, their metabolites, and "Crack" pyrolysis products by gas chromatography-mass

spectrometry. *Clin Chem.* **1994**; 40:1299-305.

**Cone EJ, Oyler J, Darwin WD,** Cocaine disposition in saliva following intravenous, intranasal and smoked administration. *J Anal Toxicol.* **1997**;21:465-75.

**Cone EJ, Huestis MA,** Relating blood concentrations of tetrahydrocannabinol and metabolites to pharmacologic effects and time of marijuana usage. *Ther Drug Monit.* **1993**; 15:527-32.

**Cone EJ,** Testing human hair for drugs of abuse. Individual dose and time profiles of morphine and codeine in plasma, saliva, urine, and beard compared to drug-induced effects on pupils and behavior. *J Anal Toxic.* **1990**; 14:1-7.

**Concheiro M, Castro A, Quintela O, Cruz A, López-Rivadulla M,** Determination of illicit and medicinal drugs and their metabolites in oral fluid and preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* **2008**; 391:2329-38.

**Concheiro M, Castro A, Quintela O, Cruz A, López-Rivadulla M, J** *Chromatogr B.* **2004**; 810:319-24.

**Consensus Development Panel (CDP),** Drug concentration and driving impairment. *J Am Med Assoc.* **1985**; 254:2618-28.

**Council of Europe,** *Conclusions and recommendations. In Road Traffic and drugs.* Strasbourg, **1999**; 319-23.

**Crouch DJ,** Oral fluid collection: the neglected variable in oral fluid testing. *Forensic Sci Int.* **2005**; 150:165-73.

## D

**D'Asaro JA,** An automated and simultaneous solid-phase extraction of D9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-D9-tetrahydrocannabinol from whole blood using the Zmark Rapid Trace<sup>®</sup> with confirmation and quantitation by GC-EI-MS. *J Anal Toxicol.* **2000**; 24:289-95.

**Daily Med,** [<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=3788>, **2004**]

**Davis BD,** The binding of sulphonamide drugs by plasma proteins. A factor in determining the distribution

of the drugs in the body. *J Clin Invest.* **1943**; 22:753-62.

**Dawes C**, Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *J Physiol.* **1972**; 220:529-545.

**Dawes C**, Physiological factors affecting salivary flow rate, oral sugar clearance, and the sensation of dry mouth in man. *J Dent Res.* **1987**; 66:648-653.

**De Gier JJ**, Review of investigations of prevalence of illicit drugs in road traffic in different European countries. *Road Traffic and Drugs.* **1999**; 13-61

**De Vane e Nemeroff, 2000**, Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. *Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica.* 9ª edição. 459-489; Mc Graw-Hill.

**Dechant KL, Clissold SP**, Paroxetine: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in depressive illness. *Drugs.* **1991**; 41:225-53.

**Dellemijn PLI, van Duijn H, Vanneste JAL**, Prolonged treatment with transdermal fentanyl in

neuropathic pain. *J Pain Symptom Manage.* **1998**; 16:220-29.

**Desmeules JA**, The Tramadol Option. *Eur. J. Pain.*, **2000**; 4 Sppl. A:15-21

**Despopoulos A, Silbernagl S**, Color Atlas of Physiology. *Thieme.* **1991**; 4<sup>th</sup> Edition: 130

**Dilli S, Pillai D**, Analysis of trace amounts of barbiturates in saliva. *J Chromatogr.* **1980**; 190:113-18.

**Direcção Geral de Saúde (DGS)**, Condução e medicamentos. [[www.dgsaude.pt](http://www.dgsaude.pt)]

**Directorate General for Energy and Transport**, *Report on drugs, medicines and driving.* Brussels, **2002**.

**Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB**, Molecular beams of macroions. *J Chem Phys.* **1968**; 49:2240-49.

**Drug Text**, [<http://www.drugtext.org/sub/opiat1.html>], **1995**]

**Drummer OH**, Drug testing in oral fluid. *Clin Biochem Rev.* **2006**; 2A(3) 147-59.

**Drummer OH**, Review: pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid. *Forensic Sci Int.* **2005**;150:133-42.

## E

---

**European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA)**, *Literature re Review on the Relation Between Drug Use, Impaired Driving and Traffic Accidents.* 1999; Lisbon. [[http://www.emcdda.org/multimedia/project\\_reports/finalreportdrugsanddriving.pdf](http://www.emcdda.org/multimedia/project_reports/finalreportdrugsanddriving.pdf)].

## F

---

**FDA – Food and Drug Administration:** U.S. Department of Health and Human Services. Guidance for industry, bioanalytical method validation. **2001**; [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs>

/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf]

**Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM**, Electrspray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* **1989**; 246:64-71.

**Foote, S.L. and Aston-Jones, G.**, Pharmacology and physiology of central noradrenergic systems. *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress.* **1995**; 335-346

**Freudenrich C**, [ <http://health.howstuffworks.com/healthillness/treatment/medicine/medications/antidepressant.htm>]

**Friedmann T**, The excretion of ingested ethyl alcohol in saliva. *J Lab Clin Med.* **1938**; 29:1007-14.

**Fucci N, De Giovanni N, Chiarotti M**, Simultaneous detection of some drugs of abuse in saliva samples by SPME technique. *Forensic Sci Int.* **2003**; 134: 40-5.

## G

- Galski T, Williams JB, Ehle HT**, Effects of opioids on driving ability. *J Pain Symptom Manage.* **2000**; 19:200-08.
- Garret JR**, The proper role of nerves in salivary secretion: a review. *J Dent Res.* **1987**; 66:387-97.
- Gaskel SJ**, Electrospray: principles and practice. *J Mass Spectrom.* **1997**; 32:677-88.
- Geddes JR, Carney SM, Davies C e col.**, Relapse prevention with antidepressant drug treatment in depressive disorders: a systematic review. *Lancet.* **2003**; 361:653-661.
- Gillen C, Haurand M, Kobelt DJ e Wnendt S**, Affinity potency and efficacy of tramadol and its metabolites at the cloned human mu-opioid receptor. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmac.* **2000**; 362(2): 116-121.
- Goldberg BA, Darwin WD, Grant TM, Allen AC, Caplan YH, Cone EJ**, Measurement of heroin and its metabolites by isotope-dilution electron-impact mass spectrometry. *Clin Chem.* **1993**; 39:670-75.
- Goodman LS, Gilman A**, *Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica.* 7ª edição. **1985**; Mc Graw-Hill.
- Goodman LS, Gilman A**, *Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica.* 9ª edição. **2006**; Mc Graw-Hill.
- Gotrick B, Tobin G**, The xerogenic potency and mechanism of action of tramadol inhibition of salivary secretion in rat. *Arch Oral Biology.* **2004**; 49:969-973.
- Gotrick B, Akerman S, Ericson D, Tortenson R, Tobin G**, Oral pilocarpine for treatment of drug-induced oral dryness in healthy adults. *J Dent Res.* **2004**;
- Grond S, Sablotzki A**, Clinical pharmacology of tramadol. *Clin Pharmacokinet.* **2004**; 43:879-923.
- Gross SJ, Worthy TE, Nerder L, Zimmermann EG, Soares JR, Lomax P**, Detection of recent cannabis use by saliva delta 9-THC radioimmunoassay. *J Anal Toxicol.* **1985**; 9(1):1-5.

**Grunenthal**, Therapeutic Approaches of Pain Management.

**Gustafson RA, Moolchan ET, Barnes A, Levine B, Huestis MA**, Validated method for simultaneous determination of delta9-tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC-THC and 11-nor-9-carboxy-THC in human plasma using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry with positive chemical ionization. *J Chromatogr B*. **2003**; 798:145-54.

**Gutstein HB e Akil H**, Analgésicos opióides. *Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 6ª edição. 487-522; Mc Graw-Hill.

## H

**Haginaka J, Wakai J**, Liquid chromatographic determination of barbiturates using a hollow-fibre membrane for postcolumn pH modification. *J Chromatogr*. **1987**; 390:421-28.

**Healy D**, The antidepressant era. *Harvard University Press*. Cambridge and London, **1997**.

**Hill JL, Zancy JP**, Comparing the subjective, psychomotor and physiological effects of intravenous hydromorphone and morphine in healthy volunteers. *Psychopharmacology*. **2000**; 152:31-39.

**Hindmarch I, Subhan Z, Stoker MJ**, The effects of zimeldine and amitriptyline on car driving and psychomotor performance. *Acta Psychiatr Scand*. **1983**; 308:141-146.

**Hold K, de Boer D, Zuidema J, Maes RA**, Saliva as an analytical tool in toxicology. *Int J Drug Test*. **1995**; 1:1-36.

**Hoja H, Marquet P, Verneuil B, Lofti H, Pénicaut B, Lachâtre G**, Applications liquid chromatography-mass spectrometry in analytical toxicology: a review. *J Anal Toxicol*. **1997**; 21:116-26.

**Horning EC, Carroll DI, Dzidic I, Haegele KD, Horning MG, Stillwell RN**, Liquid chromatograph-mass spectrometer-computer analytical systems. Continuous flow system based on atmospheric pressure

ionization mass spectrometry. *J*

*Chromatogr.* **1974**; 99:13-21.

**Huber HP**, Examination of psychic effects of a new analgesic agent of the cyclohexanol series. *Arzneim-Forsch Drug Res.* **1978**; 28:189-191.

**Huestis MA, Cone EJ**, Alternative testing matrices. *Drug Abuse Handbook*. Karch SB ed, CRC Press, Boca Raton. **1998**; 799-857.

**Huestis MA, Scheidweiler KB, Saito T, Fortner N, Abraham T, Gustafson RA, Smith ML**, Excretion of Delta9-tetrahydrocannabinol in sweat. *Forensic Sci Int.* **2008**; 174(2-3):173-7.

**Hunter KD, Wilson WS**, The effects of antidepressant drugs on salivary flow and content of sodium and potassium ions in human parotid saliva. *Archs Oral Biol.* **1995**; 40(11):983-89.

## I

---

**ICH Q2 (R1)** – ICH of technical requirements for registration of

pharmaceuticals for Human.

Validation of analytical procedures: *Text and Methodology Q2 (R1)*. **2005**; [<http://www.ich.org/cache/compo/363-272-1.html#Q2A>].

**Idowu OR, Caddy B**, A review of the use of saliva in the forensic detection of drugs and other chemicals. *J Forensic Sci Soc.* **1982**; 22:123-35.

**Índice Nacional Terapêutico (I.N.T.)**, **2009**.

**Infarmed- Estatística do Medicamento**, **2005**.

**Infarmed- Estatística do Medicamento**, **2006**.

**Infarmed- Estatística do Medicamento**, **2007**.

**Iribarne JV, Thomson BA**, On the evaporation of small ions from charged droplets. *J Chem Phys.* **1976**; 64:2287-94.

**Inaba T, Stewart DJ, Kalow W**, Metabolism of cocaine in man. *Clin Pharmacol Ther.* **1978**; 23:547-52.

**International Council on Alcohol Drugs & Traffic Safety (ICADTS)**, Categorization system for medicinal drugs affecting driving performance. **2007**.

**Iwamoto K, Takahashi M, Nakamura Y, Kwamura Y, Ishihara R, Uchimiyama Y, Ebe K, Noda A, Noda Y, Yoshida K, Iidaka T, Ozaki N,** The effects of acute treatment with paroxetine, amitriptyline, and placebo on driving performance and cognitive function in healthy Japanese subjects: a double-blind crossover trial. *Hum Psychopharmacol Clin Exp.* **2008;** 23:399-407.

## J

**Jemal H,** High-throughput quantitative bioanalysis by LC/MS/MS. *Biomed Chromatogr.* **2000;** 14:422-29.

**Jenkins AJ, Oyler JM, Cone EJ,** Comparison of heroin and cocaine concentrations in saliva with concentrations in saliva with concentrations in blood and plasma. *J Anal Toxicol.* **1995;** 19:359-74.

**Jones AW,** Pharmacokinetics of ethanol in saliva: comparison with blood breath alcohol profiles, subjective feelings of intoxication and diminished performance. *Clin Chem.* **1993;** 39:1837-44.

## K

**Kang GI, Abbot FS,** Analysis of methadone and metabolites in biological fluids with gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr.* **1982;** 231:311-19.

**Kadehjian L,** Legal issues in oral fluid testing. *Forensic Sci Int.* **2005;** 150:151-60

**Kato K, Hillsgrove M, Weinhold L, Gorelick DA, Darwin WD, Cone EJ,** Cocaine and metabolite excretion in saliva under stimulated and nonstimulated conditions. *J Anal Toxicol.* **1993;** 17:338-41.

**Kidwell DA, Holland JC, Athanasis S,** Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. *J Chrom B.* **1998;** 713:111-35.

**Kintz P, Villain M, Concheiro M, Cirimele V,** Screenig and confirmatory method for benzodiazepines and hypnotics in oral fluid by LC/MS/MS. *Forensic Sci Int.* **2005;** 150:213-20.

**Kintz P, Samyn N,** Use of alternative specimens: drugs of abuse in saliva

and doping agents in hair. *Ther Drug Monit.* **2002**; 24:239-46.

**Kirsch I, Sapirstein G**, Listening to Prozac but hearing placebo: a meta-analysis of antidepressant medication. *Prevention Treatment.* **1998**; 1(0002a):1-13.

**Kirsch I, Moore TJ, Scoboria A, Nicholls SS**, The emperor's new drugs: an analysis of antidepressant medication data submitted to the US food and drug administration. *Prevention Treatment.* **2002**; 5(23)

**Klotz U**, Tramadol: The Impact of its Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties on the Clinical Management of Pain. *Arzneim Forsch Drug Res.* **2003**; 53: 681-7.

**Knott C, Reynolds F**, Value of saliva anticonvulsivante monitoring in pregnancy and the newborn. *J Clin Chem Clin Biochem.* **1989**; 27(4):227-28.

**Koysooko R, Ellis EF, Levy G**, Relationship between theophylline concentration in plasma and saliva of man. *Clin Pharmacol Ther.* **1974**; 15:454-60.

**Kragh-Sorensen P, Stage B**, The concept of melancholia and

antidepressant treatment. *Salud Mental.* **2004**; 27(5)1-7.

**Kress HG, Kraft B**, Opioid medication and driving ability. *European Journal of Pain.* **2005**; 9:141-44

**Kuaert GF, Moeller MR, Maurer MJ, Steinmeyer S, Toennes SW**, Statistical evaluation of analytical findings from corresponding blood and oral fluid taken at the roadside. *Ann Toxicol Anal.* **2002**; 14(3):226.

**Kukanich B, Papich MG**, *J Vet Pharmacol Ther.* **2004**; 27:239-46.

## L

---

**Laloup M, Ramirez Fernandez MM, Wood M, De Boeck G, Henquet C, Maes V, Samyn N**, *J Chromatogr A.* **2005**; 1082(1):15-24.

**Larsen B, Otto H, Dorscheid E, Larsen R**, Effects of long-term opioide therapy on psychomotor function in patients with cancer pain or non-malignant pain. *Anaesthesist.* **1999**; 48:613-24.

- Lee CR, McTavish D, Sorkin EM,** Tramadol. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in acute and chronic pain states. *Drugs*. **1993**; 46(2): 313-40.
- Lei nº18/2007 de 17 de Maio.** Aprova o Regulamento de Fiscalização da Condução sob Influência do Álcool ou de Substâncias Psicotrópicas.
- Leitman R, Binns K, Unni A,** *National Pain Survey*. New York: Louis Harris and Associates, **1994**
- Leonard Richelson 2000,** Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. *Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 9ª edição*. 459-489; McGraw-Hill.
- Leute R, Ullman EF, Goldstein A,** Spin immunoassay of opiate narcotics in urine and saliva. *JAMA*. **1972**; 221:1231-34.
- Leveille SG, Buchner DM, Koepsell TD, McCloskey LW, Wolf ME, Wagner EH,** Psychoactive medications and injurious motor vehicle involving older drivers. *Epidemiology*. **1994**; 5:591-598.
- Liao S, Hill JF, Nayak RK,** Pharmacokinetics of tramadol following single and multiple oral doses in man. *Pharm Res*. **1992**; 9 (Suppl):308
- Lingeman H, Hoeskstra-Oussoren SJF,** Particle loaded membranes for sample concentration and/or clean – up in bioanalysis. *J Chromatography B*. **1997**; 689:221-37.
- Lintz W, Beier H, Gerloff J,** Biotransformation of tramadol in man. *Drugs Res*. **1981**; 31:1932-43.
- Lintz W, Barth H, Osterloh G Schmidt-Bothelt E,** Bioavailability of enteral tramadol formulations. *Arzneim-Forsch Drug Res*. **1986**; 36:1278-1283
- Lorenz J, BeckiH, Bromm B,** Cognitive performance, mood and experimental pain before and during morphine-induced analgesia in patients with chronic non-malignant pain. *Pain*. **1997**; 73:369-75.
- Lullmann H, Mohr K, Ziegler A, Bieger D,** Color Atlas of Pharmacology. *Thieme*. **2000**; 2<sup>nd</sup> Edition: 210-220.

## M

---

**Magerl H, Schulz E**, Methods of saliva analysis and the relationship between saliva and blood concentration.

[<http://www.druglibrary.org/schaffer/MISC/driving/s3p1.htm>]

**Malonne H, Sonet B, Strel B, Lebrun S, De Niet S, Sereno A, Vanderbist F**, Pharmacokinetic evaluation of a new oral sustained release dosage form of tramadol. *British Journal of Clinical Pharmacology*. **2003**; 57(3):270-78.

**Malseed RT e Goldstein FJ**, Enhancement of morphine analgesia by tricyclic antidepressants. *Neuropharmacology*. **1979**; 18: 827-829.

**Mandel ID**, The functions of saliva. *J Dent. Res.* **1987**; 66:623-627.

**Manzo RH, Oliveira ME, Amidon GL, Shah VP, Dressman JB, Barends DM**, Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: amitriptyline hydrochloride. *J Pharm Sci.* **2006**; 95(5):966-73.

**Marin SJ, Coles R, Urry FM, McMillin GA**, Confirmation of cannabinoids in meconium using two-dimensional gas chromatography with mass spectrometry detection. *Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **2007**; 858(1-2):59-64.

**Marquet P, Lachâtre G**, Liquid chromatography-mass spectrometry: potential in forensic and clinical toxicology. *J Chromatogr B.* **1999**; 733:93-118.

**Matusewski BK, Chavez-Eng CM, Constanzer ML**, Development of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods for the determination of a new oxytocin receptor antagonist (L-368,899) extracted from human plasma and urine: a case of lack of specificity due to the presence of metabolites. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **1998b**; 716:195-208

**Matusewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM**, Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analysis of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations. *Anal Chem.* **1998a**; 70:882-89.

**Maurer HH**, Systematic toxicological analysis of drugs and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr.* **1992**; 580:3-41.

**Maurer HH**, Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **1998**; 713:3-25.

**Maurer HH**, Position of chromatographic techniques in screening for detection of drugs or poisons in clinical and forensic toxicology and/or doping control. *Clin Chem Lab Med* **2004**; 42:1310-24.

**Max MB**, Improving outcomes of analgesic treatment: is education enough?. *Ann Intern Med.* **1990**; 113: 885-889.

**McCaffrey M**, Pain control: barriers to the use of available information. *Cancer.* **1992**; 70:1438-1449.

**McDowall RD**, Sample preparation of biomedical analysis. *J Chromatography.* **1989**; 49:3-58.

**Medscape**, Monograph – Tricyclic Antidepressants General Statement. [<http://www.medscape.com>]

**Mendham J, Denney RC, Barnes JD, Thomas M**, Análise química

quantitativa – Vogel – 6ª Edição. Rio de Janeiro: LTC editora; **2002**, pp. 144-59.

**Merlin, MD**: On the trail of the ancient opium poppy. *Associated University Presses*, Cranbury, 1984.

**Moncrieff J**, The antidepressant debate. *Editorial, Brit J Psych.* **2002**; 180:193-194.

**Moore C, Rana S, Coutler C**, Determination of meperidine, tramadol and oxycodone in human oral fluid using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B.* **2007**; 850:370-375.

## N

**Nemeroff CB**, Improving antidepressant adherence. *J Clin Psychiatry.* **2003**; 64(Suppl18):25-30.

**Neutel I**, Benzodiazepine-related traffic accidents in young and elderly drivers. *Hum Psychopharmacol Clin Exp.* **1998**; 13:S115-S123.

Niessen WMA, Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. *J Chromatogr A*. **2003**; 1000:413-36.

## O

---

O'Hanlon JF e col., Performance testing as part of new drug registration. *Drugs and Driving*. **1986**; 311-327.

O'Neal CL, Crouch DJ, Rollins DE, Fatah AA, The effects of collection methods on oral fluid codein concentrations. *J Anal Toxicol*. **2000**;24: 536-42.

Ortho-McNeil Pharmaceuticals, *Ultram package insert*. **1995**.

## P

---

Paar WD, Poche S, Gerloff J e col., Polymorphic CYP2D6 mediates O-desmethylation of the opióide

analgesic tramadol. *Eur J Clin Pharmacol*. **1997**; 53:235-39.

Parker G, New and old antidepressants: all equal in the eyes of the lore?. *Brit J Psychiatry*. **2001**; 179:95-96.

Paxton JW, Measurement of drugs in saliva: a review. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. **1979**; 1:11-21.

Peel HW, Perrigo BJ, Mikhael NZ, Detection of drugs insaliva of impaired drivers. *J Forensic Sci*. **1984**; 29:185-89.

Perry e col., **1994**, Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. *Goodman e Gliman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 9ª edição. 459-489; Mc Graw-Hill.

Peters FT, Method of validation using LC-MS. *Appllications of LC-MS in Toxicology*. A. Poletini, ed., Pharmaceutical Press, Londres, **2006**, pp.71-95.

Peters FT e Maurer HH, Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – a review. *Accredit Qual Assur*. **2002**; 7:441-49.

**Pollock e Perel, 1989**, Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. *Goodman e Gliman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 9ª edição. 459-489; Mc Graw-Hill.

**Potter e col. 1998** Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. *Goodman e Gliman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 9ª edição. 459-489; Mc Graw-Hill.

**Prasertsawat PO, Herabutya Y, Chaturachinda K**, Obstetric analgesia: comparison between tramadol, morphine and pethidine. *Curr Ther Res*. **1986**; 40:1022-28

**Preskorn, 1997**, Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. *Goodman e Gliman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 9ª edição. 459-489; Mc Graw-Hill.

**Preston KL, Jasinski DR, Testa M**, Abuse potential and pharmacological comparison of tramadol and morphine. *Drug Alcohol Depend*. **1991**; 27(1):7-17.

**Prouty e Anderson, 1990**, , Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de

ansiedade. *Goodman e Gliman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 9ª edição. 459-489; Mc Graw-Hill.

**Prox A, Breyer-Pfaff**, Amitriptyline metabolites in human urine. Identification of phenols, dihydrodiols, glycols, and ketones. *Drug Metab Dispos*. **1987**; 15:890-96.

## R

**Raes E, Verstraete A**, Cannabis et conduire automobile: la situation en Europe. *Ann Pharm Fr*. **2006**; 64:197-203.

**Raffa RB, Friderichs E, Reimann W, Shank RP, Codd EE, Vaught JL**: Opioid and Nonopioid Components Independently Contribute to the Mechanism of Action of Tramadol, an Atypical Opioid Analgesic. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **1992**; 260 :275-85

**Raffa RB, Friderichs E, Reimann W, e col.**: Complementary and synergistic antinociceptive interaction between the enantiomers of tramadol. *J Pharmacol Exp Ther*. **1993**; 267: 331-340

**Ramaekers JG**, Antidepressants and driver impairment: empirical evidence from a standard on-the-road test. *J Clin Psychiatry*. **2003**; 64:20-29.

**Rauk RL, Ruoff GE, McMillen JI**, Comparison of tramadol and acetaminophen with codein for long-term pain management in elderly patients. *Curr Ther Res*. **1994**; 55:1217-1431.

**Ray WA, Fought RL, Decker MD**, Psychoactive drugs and the risk of injurious motor vehicle crashes in elderly drivers. *Am J Epidemiol*. **1992**; 136:873-883.

**Resumo das Características do Medicamento**, Cloridrato de Amitriptilina FUNED.

**Ritschel WA, Tompson GA**, Monitoring of drug concentration in saliva: a non-invasive pharmacokinetic procedure. *Meth Find Exp Clin Pharmacol*. **1983**; 5:511-25.

**Roth GI, Calmes R**, *Oral Biology*, Chaps 8 and 9. **1981**; Mosby, St. Louis.

**RxMed, 2004**  
[<http://www.rxmed.com/b.main/b2.pharmaceutical/b2.prescribe.html>].

## S

---

**Sabatowski R, Schwalen S, Rettig K, Herberg KW, Kasper SM, Radbruch L**, Driving ability under long-term treatment with transdermal fentanyl. *J Pain Symptom Manage*. **2003**; 25:38-47.

**Schatzberg e col 1997**, Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. *Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 9ª edição*. 459-489; Mc Graw-Hill.

**Schubert MM, Izutsu KT**, Iatrogenic causes of salivary gland dysfunction. *J Dent Res*. **1987**; 66:680-87.

**Scott LJ e Perry CM**, Tramadol - a review of its use in perioperative pain. *Drugs*. **2000**; 60(1):139-176.

**Sharp ME, Wallace SM, Hindmarsh KW, Peel HW**, Monitoring saliva concentrations of methaqualone, codein, secobarbital, diphenhydramine and diazepam after single oral doses. *J Anal Toxicol*. **1983**; 7:11-14.

- Schepers RJ, Oyler JM, Joseph RE Jr, Cone EJ, Moolchan ET, Huestis MA**, Methamphetamine and amphetamine pharmacokinetics in oral fluid and plasma after controlled oral methamphetamine administration to human volunteers. *Clin Chem.* **2003**; 49:131-32.
- Shein K, Smith SE**, Structure-activity relationships for the anticholinergic action of tricyclic antidepressants. *Br J Pharmacol.* **1978**; 62:567-571.
- Shiga Y, Minami K, Shiraishi M, Uezono Y, Murasaki O, Kaibara M e col.**, The inhibitory effects of tramadol on muscarinic receptor-induced responses in *Xenopus* oocytes expressing cloned M(3) receptors. *Anesth Analg.* **2002**; 95(5): 1269-73.
- Siegel IA**, The role of saliva in drug monitoring. *Ann NY Acad Sci.* **1993**; 694: 86-90.
- Skoop G, Strohbeck-Kuehner P, Mann K, Hermann D**, Deposition of cannabinoids in hair after long-term use of cannabis. *Forensic Sci Int.* **2007**; 170(1): 46-50.
- Skopouli FN, Siouna-Fatourou HI, Ziciadis C, Moutsopoulos HM**, Evaluation of unstimulated whole saliva flow rate and stimulated parotid flow as confirmatory tests for xerostomia. *Clin Exp Rheumatol.* **1987**; 7:127-129.
- Skurtveit S, Abotnes B, Christophersen AS**, Drugged drivers in Norway with benzodiazepine detections. *Forensic Sci Int.* **2002**; 125:75-82.
- Sreenby LM**, Saliva – salivary gland hypofunction (SGH). *J Dent Assoc S Afr.* **1992**; 83(5):393-97.
- Sreenby LM, Schwartz SS**, A reference guide to drugs and dry mouth. *Gerodontology.* **1997**; 14:33-47.
- Sreenby LM, Valdini A**, Xerostomia. Part I: relationship to other oral symptoms and salivary gland hypofunction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* **1988**; 66:451-58.
- Sreenby LM, Valdini A, Yu A**, Xerostomia Part II: relationship to non-oral symptoms, drugs, and diseases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* **1989**; 68:419-427.
- Staritz M, Poralla T, Manns M, Mayer zum Buschenfelde KH**, Effect of modern analgesic drugs (tramadol, pentazocine, and buprenorphine) on

the bile duct sphincter in man. *Gut*.

1986; 27:567-69.

**Strumpf M, Zenz M, Willweber-Strumpf A**, Analysis of the therapy of chronic pain. A comparison of previous therapy and specialized pain therapy. *Anaesthesist* 1993, 42:169-174.

**Strumpf M, Kohler A, Zenz M, Willweber-Strumpf A, Dertwinkel R, Donner B**, Opioids and driving ability. *Schmerz*. 1997; 11:233-40.

**Sulser F, Mobley PL**, Adrenal-steroids affect the norepinephrine-sensitive adenylate-cyclase system in the rat limbic forebrain. *European Journal of Pharmacology*. 1980; 65 (2-3): 321-322.

**Susuki S, Inoue T, Hori H, Inayama S**, Analysis of methamphetamine in hair, nail, sweat, and saliva by mass fragmentography. *J Anal Toxicol*. 1989; 13:176-78.

## T

---

**Tacke U**, Fluoxetine: an alternative to the tricyclics in the treatment of major depression?. *Am J Med Sci*. 1989; 298:126-129.

**Tavares JC**, Analgésicos de acção central e seus antagonistas. *Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas, 4ª Edição*, Porto, 2001, 163-178

**Taylor PJ**, Method development and optimization of LC-MS. In: Applications of LC-MS in toxicology, Poletini A, Ed., Pharmaceutical press, Londres, 2006, pp. 23-42.

**Teixeira H, Proença P, Verstraete, Corte-Real F, Vieira DN**, Analysis of delta9-tetrahydrocannabinol in oral fluid using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Forensic Sci Int*. 2005; 150:205-11.

**Thase ME**, Antidepressant effects: The suit may be small but the fabric is real. *Prevention Treatment*. 2002; 5(32).

- Thase e Nolen 2000**, Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. *Goodman e Gliman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 9ª edição. 459-489; Mc Graw-Hill.
- Taylor PJ**, Method development and optimization of LC-MS. In: *Applications of LC-MS in Toxicology*, Poletti A, ed, Pharmaceutical Press, Londres, **2006**, pp. 23-44.
- The Pharmaceutical Codex**, Principles and practice of Pharmaceutics, 12<sup>th</sup> edn. *Pharmaceutical Press*. **1994**.
- The RW Johnson Pharmaceutical Research Institute**, Spring House, Pennsylvania, **1992**.
- Thomas A, Widmer C, Hopfgartner G, Staub C**, Fast gas chromatography and negative-ion chemical ionization tandem mass spectrometry for forensic analysis of cannabinoids in whole blood. *J Pharm Biomed Anal*. **2007**; 45(3):495-503.
- Thomas DR, Nelson DR, Johnson AM**, Biochemical effects of the antidepressant paroxetine, a specific 5-hydroxytryptamine uptake inhibitor. *Psychopharmacology*. **1987**; 93:193-200.
- Thomas P e Gibson MD**, Pharmacokinetics, efficacy, and safety of analgesia with focus on tramadol HCl. *The American Journal of Medicine*. **1996**; 101 (suppl 1A) 47-53.
- Tjaden UR, Meeles MT, Thys CP, Van Der Kaay M**, Determination of some benzodiazepines and metabolites in serum, urine and saliva by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*. **1980**; 181:227-41.
- Tollefson GD, Senogles SE**, A comparison of first and second generation of antidepressants at the human muscarinic cholinergic receptor. *J Clin Psychopharmacol*. **1983**; 3:231-34.
- Tollefson e Rosenbaum, 1998**, Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. *Goodman e Gliman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 9ª edição. 459-489; Mc Graw-Hill.
- Tramadol Information**, [<http://www.tramadoinfo.com/articles/history.html>]
- Troupin AS, Friel P**, Anticonvulsant level in saliva, serum and cerebrospinal fluid. *Epilepsia*. **1975**; 16:223-27.

**Turner GJ, Cobert DL, Chowdry BZ**, A broad spectrum immunoassay using fluorescence polarization for the detection of amphetamines in urine. *Ann Clin Biochem.* **1991**; 28:588-94.

## U

---

**United Nations**, Guidelines for testing drugs under international control hair, sweat and saliva. Vienna, **1998**.

## V

---

**Vainio A, Ollila J, Matikainen E, Rosenberg P, Kalso E**, Driving ability in cancer patients receiving long-term morphine analgesia. *Lancet.* **1995**; 346:667-70.

**Van Harten, 1993**, Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. *Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 9ª edição.* 459-489; Mc Graw-Hill.

**Varma MV, Sateesh K, Panchagnula R**, Functional role of P-glycoprotein in limiting intestinal absorption of drugs: contribution of passive permeability to P-glycoprotein mediated efflux transport. *Mol Pharm.* **2005**; 2:12-21.

**Venkatakrishnan K, Schmider J, Harmatz JS, Ehrenberg BL, von Moltke JA, Graf JÁ, Mertzanis P, Corbett KE, Rodriguez MC, Shader RI, Greenblatt DJ**, Relative contribution of CYP3A to amitriptyline clearance in humans: invitro and in vivo studies. *J Clin Pharmacol.* **2001**; 41:1043-1054.

**Verebey K, De Pace A, Jukofsky D, Volavka JV, Mulé SJ**, Quantitative determination of 2-hydroxy-3-methoxy-6-beta-naltrexol in human plasma, red blood cells, saliva, and urine by gas liquid chromatography. *J Anal Toxicol.* **1980**; 4:33-37.

**Verstraete AG**, Detection times of drugs of abuse in blood, urine and oral fluid. *Therap Drug Monit.* **2004**; 26:200-05.

**Verstraete AG**, Oral fluid testing for driving under the influence of drugs: history, recent progress and remaining

challenges. *Forensic Science International*. **2005**; 150:143-150.

**Viguera e col. 1998**, Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. *Goodman e Gliman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 9ª edição. 459-489; Mc Graw-Hill.

**Vogel W, Burhardi H, Sihler K, Valic L**, The respiratory and circulatory effects of tramadol. *Arzneim-Forsch Drug Res*. **1978**; 28:183-86.

**Voyksner RD**, Combinig liquid chromatography with electrospray MS. In: Fundamentals, Instrumentation and applications, Cole RB, Ed. Wiley-Interscience, Nova York, **1997**, pp. 223-42.

## W

**Walsh BT, Seidman SN, Sysko R, Gould M**, Placebo response in studies of major depression. Variable, substantial and growing. *JAMA*. **2002**; 287(14):469-473.

**Walsh JM, De Gier JJ, Christopherson AS, Verstraet AG**, Drugs and driving. *Traffic Inj Prev*. **2004**; 5:241-53.

**Wamsley e col. 1987**, Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. *Goodman e Gliman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 9ª edição. 459-489; Mc Graw-Hill.

**Wan SH, Martin SB, Azarnoff DL**, Kinetics, salivary excretion of amphetamine isomers, and effect of urinary pH. *Clin Pharmacol Ther*. **1978**; 23:585-90.

**Weinmann W, Goerner M, Vogt S, Goerke R, Pollak S**, Fast confirmation of 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol (THC\_COOH) in urine by LC/MS/MS using negative atmospheric-pressure chemical ionization (APCI). *Forensic Science International*. **2001**; 121:103-07.

**Wen B, Ma L, Zhu M**, Bioactivation of the tricyclic antidepressant amitriptyline and its metabolite nortriptyline to arene oxide intermediates in human liver microsomes and recombinant P450s.

*Chemico-Biological Interactions.*

2008; 173:59-67.

**Wilens e col., 1992**, Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. *Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 9ª edição.* 459-489; McGraw-Hill.

**Wood JH, Flora KP, Narasimhachari N, Baker CA**, Dependence of salivary drug concentration on salivary flow rate. *Meth Find Exp Clin Pharmacol.* **1982**; 4:255-60.

**Worz R**, Control of cancer pain with analgesics acting in the central nervous system. *Recent Results Cancer Res.* **1984**; 89:100-06.

**WHO Expert Committee on Drug Dependence**: WHO Health Organisation. Geneva: WHO Technical Report (34<sup>th</sup> Report), **2006**.

**Williams HJ**, Tramadol Hydrochloride: Something New In Oral Analgesic Therapy. *Current Therapeutic Research.* **1997**; Vol. 58, Nº 4

## Y

---

**Yalein I, Aksu F, Belzung C**, *Eur J Pharmacol.* **2005**; 514:165-174.

**Yan Z, Caldwell GW**, Stable-isotope trapping and highthroughput screenings of reactive metabolites using the isotope MS signature. *Anal Chem.* **2004**; 76:6835-47.

## Z

---

**Zeleny J**, Instability of electrified liquid surfaces. *Phys Rev.* **1917**; 10:1-6.

**Zimmerman M, Mattia JI, Posternak MA**, Are subjects in pharmacological treatment trials of depression representative of patients in routine clinical practice. *Am J Psychiatry.* **2002**; 159:469-73.

**Zweipfenning P, Wilderink A,  
Horsthuis P, Franke J, Zeeuw R,**  
Toxicological analysis of whole blood  
samples by means of Bond-Elut  
Certify Columns and gas  
chromatography with nitrogen –  
phosphorus detection. *J*  
*Chromatography A*. **1994**; 674:87-95.

