



Vera Lúcia Gouveia Alves

**Desenvolvimento e Validação de Novas Metodologias Analíticas  
Baseadas na MEPS/UHPLC-PDA e QuEChERS/UHPLC-PDA  
para a Determinação de Antidepressivos em Amostras de Urina**

Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses

FMUC

Junho/2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA





FMUC FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Vera Lúcia Gouveia Alves

**Desenvolvimento e Validação de Novas Metodologias Analíticas  
Baseadas na MEPS/UPHLC-PDA e QuEChERS/UHPLC-PDA para a  
Determinação de Antidepressivos em Amostras de Urina**

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Medicina Legal e  
Ciências Forenses

Orientadora: Professora Doutora Helena Maria Sousa Ferreira Teixeira

Co-orientador: Professor Doutor José de Sousa Câmara

Junho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Helena Teixeira, o meu mais sincero agradecimento pela orientação, mesmo que à distância mostrou estar sempre disponível para responder às dúvidas e questões surgidas durante este trabalho. Quero agradecer pela sua preocupação, atenção, incentivo e compreensão ao longo da realização deste projeto.

Ao Professor Doutor José S. Câmara quero expressar o meu agradecimento pela coorientação, pela oportunidade, disponibilidade, pelo conhecimento transmitido e por todo o apoio prestado para concluir este trabalho.

Ao Coordenador de Curso Professor Doutor Duarte Nuno Vieira, por consentir a realização deste trabalho, pois sem a sua aprovação não seria possível a concretização do mesmo.

À Universidade da Madeira e em particular ao Centro de Química da Madeira (CQM) pelas condições fornecidas para a elaboração desta dissertação e à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) pelo financiamento do projeto PEst-OE/QUI/UI0674/2014 (CQM, fundos do Governo Português) e da Rede Portuguesa de MS (RNEM/2014).

À Casa de Saúde S. João de Deus do Funchal (ISJD), nomeadamente ao Diretor Eduardo Lemos, ao Enf.º Manuel Freitas, a todos os enfermeiros e auxiliares pela disponibilidade e colaboração na recolha das amostras e aos pacientes que cooperaram com este estudo, embora no anonimato, foi fundamental a contribuição destes para a sua realização.

Aos meus colegas de laboratório, João, Carlota, Carina, Catarina, Enderson, Helena, Paula, Rosa e Mariangie por todo o apoio, disponibilidade, sugestões, colaboração, amizade e pelos sorrisos nos dias de menor ânimo.

Ao meu marido Paulo, por todo amor e carinho, pela paciência, pela motivação e força transmitidos diariamente.

Aos meus pais Susana e Leonel e à minha irmã Cristina, por acreditarem em mim, pelo amor, compreensão, apoio e por toda a dedicação e sacrifícios que se submeteram para que pudesse progredir na minha formação.

À minha avó Isabel e à minha avó Lúcia, a qual dedico este trabalho, que apesar de já não estar presente sempre foi a minha maior fã. Agradeço-lhes pela motivação e dedicação que sempre me deram.

E por fim, a todos os que de certa forma cooperaram para que este trabalho fosse elaborado, o meu sincero obrigado.



## RESUMO

A descoberta dos medicamentos antidepressivos no final dos anos 50, tornou a depressão um problema médico passível de tratamento. Assim sendo, nas últimas décadas, a psicofarmacologia da depressão evoluiu muito rapidamente, surgindo novos fármacos antidepressivos, retratando-se num aumento de 240% no consumo destes.

Contudo, apesar da eficácia antidepressiva e da semelhante gama de indicações, cada antidepressivo possui propriedades individuais, não só farmacodinâmicas como também farmacocinéticas, resultando num perfil de indicações clínicas diferente, assim como efeitos adversos e inclusivamente interações medicamentosas. Além disso, a sua possível aquisição de forma ilegal, contribui para os problemas de automedicação e aumento do risco de suicídio por parte dos indivíduos.

Assim sendo, e face aos efeitos colaterais causados por estes medicamentos, torna-se crucial o desenvolvimento de metodologias analíticas que possibilitem a identificação e quantificação destes fármacos em matrizes biológicas de uma forma rápida, simples e económica. Neste sentido, surge o presente estudo cujo objetivo prende-se com a determinação de dois antidepressivos de classes diferentes, nomeadamente a fluoxetina, a clomipramina e os respetivos metabolitos ativos norfluoxetina e desmetilclomipramina, em amostras de urina. Foram utilizadas duas técnicas de preparação de amostra distintas, a microextração por sorvente empacotado (MEPS) e o QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*), seguidas de análise por cromatografia líquida de ultra eficiência com detetor de fotodiodos (UHPLC-PDA).

Foram avaliados neste trabalho os fatores que influenciam o desempenho da MEPS (tipo de sorvente, número de ciclos de extração, volume de amostra, pH da amostra, sistema de solventes e volume de eluição) e do QuEChERS (volume de amostra, solvente de extração, efeito *salting out*, etapa do *clean up*). As melhores condições de extração por MEPS foram obtidas usando um sorvente C<sub>18</sub> como fase estacionária e 500 µL como volume de amostra de urina com 5 ciclos de extração. As análises dos extratos obtidos foram efetuadas com recurso a um sistema UHPLC-PDA, utilizando uma coluna analítica de fase reversa Acquity UPLC® HSS T3. A fase móvel utilizada consistiu numa mistura de acetonitrilo e uma solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%, num gradiente de concentração ao longo da separação cromatográfica e com um fluxo constante de 250 µL/min. Relativamente à extração por QuEChERS as melhores condições foram adquiridas com 2 mL de amostra de urina e usando acetato de etilo como solvente de extração. Os extratos foram igualmente analisados utilizando o mesmo método cromatográfico descrito anteriormente.

A validação dos métodos analíticos incluiu o estudo de vários parâmetros como a seletividade, linearidade, limiares analíticos, eficiência de extração, precisão e exatidão. Os métodos demonstraram ser seletivos para os compostos em estudo, uma vez que não foram detetados interferentes após a análise de amostras brancas de urina, com um desempenho aceitável em termos de linearidade, registando-se coeficientes de

correlação ( $R^2$ ) acima de 0,996. Relativamente aos limites de detecção, estes mostraram-se igualmente satisfatórios com valores entre os 0,068 e 0,087  $\mu\text{g/mL}$  para a MEPS, e entre 0,060 e 0,092  $\mu\text{g/mL}$  para o QuEChERS. Quanto aos limites inferiores de quantificação, estes corresponderam à concentração mais baixa da curva de calibração (0,1  $\mu\text{g/mL}$ ). A extração evidenciou ser eficiente, tendo sido obtidas recuperações entre 99,4% e 107,1% para a MEPS e entre 93,7% e 102,2% para o QuEChERS.

Por último, para avaliar a aplicabilidade dos métodos propostos, foram analisadas 12 amostras provenientes de pacientes em tratamento com os antidepressivos em estudo. As concentrações determinadas variaram entre 0,14 e 1,73  $\mu\text{g/mL}$  para a MEPS e entre 0,13 e 1,58  $\mu\text{g/mL}$  para o QuEChERS, permitindo assim evidenciar a capacidade dos dois métodos para identificar e quantificar este tipo de substâncias.

Os métodos analíticos apresentados demonstraram ser eficientes, particularmente ao nível do tempo de análise, e suficientemente sensíveis para a detecção, identificação e quantificação da fluoxetina, clomipramina e respetivos metabolitos ativos em amostras de urina. De realçar, também, que a simplicidade das metodologias propostas torna-as compatíveis com a rotina analítica de um laboratório de toxicologia.

**Palavras-chave:** Antidepressivos, Metabolitos, Urina, MEPS, QuEChERS, UHPLC-PDA.

## ABSTRACT

The discovery of antidepressant drugs in the late 50s has rendered depression as a treatable medical problem. Therefore, in recent decades, psychopharmacology of depression has evolved very quickly, emerging new antidepressant drugs, reflected in a 240% increase in their consumption.

However, despite of antidepressant effectiveness and similar range of indications, each antidepressant has particular properties, not only pharmacodynamics but also pharmacokinetic, resulting in a different clinical indications profile as well as adverse effects and drug interactions. Furthermore, the illegal acquisition contributes to self-medication problems and increased risk of suicide among individuals.

Therefore, and considering the side effects caused by these pharmaceutical drugs, it is essential to develop analytical methodologies that enable the identification and quantification of these drugs in biological matrices in a quick, simple and economical way. In this sense, this study aims the determination of two antidepressants from different classes, namely fluoxetine, clomipramine and their active metabolites, norfluoxetine and desmethylclomipramine, in urine samples. Two sample preparation techniques were used, the microextraction by packed sorbents (MEPS) and QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) followed by ultra high performance liquid chromatography with photodiode array detector (UHPLC-PDA) analysis.

Factors that influence the performance of MEPS (type of sorbent material, number of extraction cycles, sample volume, sample pH, the solvent system and elution volume) and QuEChERS (sample volume, extraction solvent, salting out effect and clean up step) were evaluated in this work. The best extraction conditions for MEPS were obtained by using a C<sub>18</sub> sorbent as stationary phase and 500 µL as urine sample volume with five extraction cycles. The analyses of the obtained extracts were performed by UHPLC-PDA system, using an Acquity UPLC® HSS T3 reverse-phase analytical column. The mobile phase contained acetonitrile and formic acid 0.1% in a gradient of concentration along the chromatographic separation, with a constant flow of 250 µL/min. Regarding to the QuEChERS extraction, the best conditions were acquired with 2 mL of urine sample and using ethyl acetate as extraction solvent. The extracts were also analyzed with the same chromatographic method previously described.

Validation of the analytical methods included the study of selectivity, linearity, analytical thresholds, precision, accuracy and extraction efficiency. The methods proved to be selective for the studied compounds, since no interferences were detected after analysis of blank urine samples, with an acceptable performance in terms of linearity, with determination coefficients ( $R^2$ ) higher than 0.996. Concerning to the detection limits, these were equally satisfactory with values ranging between 0.068 and 0.087 µg/mL for MEPS and between 0.060 and 0.092 µg/mL for QuEChERS. As to the lower quantification limit this corresponded to the lowest concentration of the standard curve (0.1 µg/mL).

Recoveries obtained were between 99.4% and 107.1% for MEPS and between 93.7% and 102.2% for QuEChERS.

Finally, to evaluate the applicability of the proposed methods, 12 samples from patients under treatment with these antidepressants were analyzed. The determined concentrations varied between 0.14 and 1.73  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for MEPS and between 0.13 and 1.58  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for QuEChERS, which allowed demonstrate the ability of the method to identify and quantify this type of substances.

The validated methods described in this work proved to be efficient, rapid and sensitive in the detection, identification and quantification of fluoxetine, clomipramine and their active metabolites in urine samples. The simplicity of this assay makes it suitable for the analytical routine in a toxicology laboratory.

**Keywords:** Antidepressants, Metabolites, Urine, MEPS, QuEChERS, UHPLC-PDA.

# TRABALHOS CIENTÍFICOS

Alguns dos resultados obtidos nesta dissertação foram apresentados em reuniões científicas:

⇒ Como *poster* no XX Encontro Luso-Galego de Química que se realizou a 26-28 Novembro de 2014 no Porto.



**CQM**  
CENTRO DE QUÍMICA DA MADEIRA

**A powerful strategy based on microextraction by packed sorbent combined with UHPLC-PDA for simultaneous analysis of fluoxetine and clomipramine and their active metabolites in human urine**



UNIVERSIDADE da MADEIRA

**XX ENCONTRO LUSO-GALEGO DE QUÍMICA**

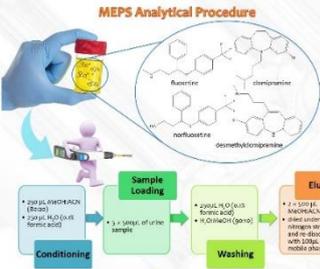
Vera Alves <sup>1</sup>, João Gonçalves <sup>1</sup>, Helena Teixeira <sup>2</sup>, José S. Câmara <sup>1,3</sup>  
<sup>1</sup> Madeira Chemistry Research Centre, <sup>2</sup> Exact Sciences and Engineering Competence Centre, Madeira University, Campus Universitário da Penteada, 9000-390 Funchal, Portugal  
<sup>3</sup> Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Azinhaga de Santa Comba, 3000-548 Coimbra, Portugal

### INTRODUCTION

Depression is one of the most common mental disorders in our society. Epidemiological evidences exist suggesting a substantial incidence increase of the disease in recent years. Over the last decade, the consumption of antidepressants (ADs) has risen in several countries in worldwide. Due to the wide variety of ADs currently available, this drug class has rapidly gained importance in both clinical and forensic fields. In this study, a sensitive, fast and accurate method based on microextraction by packed sorbent and ultra-high performance liquid chromatography with a photodiode array detector (MEPS/UHPLC-PDA) was developed and validated for simultaneous determination of fluoxetine and clomipramine and their active metabolites, norfluoxetine and desmethylclomipramine respectively, in human urine. The MEPS variables, such as sample volume, pH, number of extraction cycles and desorption conditions (solvent and solvent elution volume) were studied.

### EXPERIMENTAL

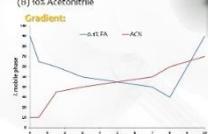
#### MEPS Analytical Procedure



#### UHPLC-PDA Conditions

Columns: ACQUITY UPLC® HSS T3 (100 × 2.1 mm; 1.8 µm, particle size)  
 Column temperature: 50 °C  
 Flow rate: 250 µL min<sup>-1</sup>  
 UV detection wavelength: 239 nm; 227 nm; 252 nm  
 Injection volume: 2 µL  
 Mobile phase: (A) 90% H<sub>2</sub>O (0.1% formic acid); (B) 10% Acetonitrile

#### Gradient

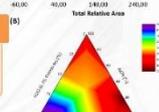


### RESULTS

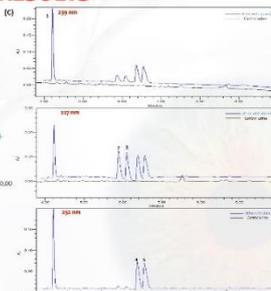
#### (A) MEPS Performance



#### (B) Three-phase solvent system



#### (C) MEPS/UPLC-PDA Chromatograms



### CONCLUSIONS

A sensitive, selective and accurate MEPS method was developed and validated for determination of ADs in urine samples. Eleven sorbents were tested and the best results were obtained with C18 sorbent. Other MEPS parameters were also optimized, and the best conditions were obtained with 5 × 500 µL of urine sample at pH 5.4 and 2 × 500 µL of MeOH/ACN (80:20 v/v) solution at elution step. The optimized method offered a good linear correlation for all antidepressants (R<sup>2</sup> > 0.996). A good precision was obtained with RSD values for repeatability and intermediate precision ranging between 3.8 – 8.5% and 3.1 – 5.8%, respectively. The LODs and LOQs were in the range of 0.078 – 0.099 µg/ml and 0.236 – 0.301 µg/ml, respectively, while recovery and matrix effect range from 84 to 96% and 77 to 84%. According to the results, MEPS could be applied to the analysis of these drugs in other matrices, as well as the analysis of other therapeutic drugs due to the rapid, easy and minimum cost of analysis.

### Validation

Peak no	RT (min)	Compound	Concentration range (µg/ml)	Regression equation	R <sup>2</sup>	LOQ (µg/ml)	LOD (µg/ml)	% Recovery	Matrix effect (%)	Precision (% RSD)	
										Intraday	Interday
2	5.760	Norfluoxetine	0.1–1.5	y = 0.202x - 0.0421	0.995	0.262	0.097	99	83.80	3.4	4.7
3	6.017	Risoxetine	0.1–1.5	y = 0.353x - 0.0813	0.996	0.301	0.094	96	77.37	4.6	4.6
4	6.332	Desmethylclomipramine	0.1–1.5	y = 0.158x - 0.0358	0.997	0.244	0.081	96	87.48	5.8	8.5
5	6.442	Clomipramine	0.1–1.5	y = 0.162x - 0.0321	0.997	0.236	0.078	94	78.24	3.1	3.8

### Acknowledgments

The authors acknowledge the Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) with funds from the Portuguese Government (Project PEST-OE/QUI/UI0674/2011) and the MS Portuguese Network (Rede/1508/RNEM/2005).

QS

XX Encontro Luso-Galego de Química, 26-28 November, 2014, Porto



⇒ Como poster no 38th International Symposium on Capillary Chromatography and 9th GCxGC Symposium que se realizou a 18-23 de Maio de 2014 em Riva del Garda, Itália.



**Simultaneous quantification of fluoxetine, clomipramine and their active metabolites in human urine samples based on MEPS followed by UHPLC-PDA analysis**

Vera Alves <sup>1</sup>, João Gonçalves <sup>1</sup>, Helena Teixeira <sup>2</sup>, José S. Câmara <sup>1,3</sup>  
<sup>1</sup> Madeira Chemistry Research Centre, <sup>2</sup> Exact Sciences and Engineering Competence Centre, Madeira University, Campus Universitário da Penteada, 9000-390 Funchal, Portugal  
<sup>3</sup> Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Azinhaga de Santa Comba, 3000-548 Coimbra, Portugal



### INTRODUCTION

Depression is one of the most prevalent psychiatric disorders in our society and epidemiological evidences exist suggesting a substantial incidence increase of the disease in recent years. Over the last decade, the consumption of drugs used to treat depression has exponentially increased in worldwide. Social disadvantages, economic crisis period and adverse changes in socioeconomic status are factors that can propitiate the increase of psychiatric illness cases and consequent increase in the antidepressants drugs consumption.

Due to the wide variety of antidepressants currently available, this drug class has rapidly gained importance in both clinical and forensic fields. In fact, therapeutic drug monitoring (TDM) for antidepressant agents is important for quality assurance in preparations and for obtaining optimum therapeutic concentrations, while minimizing the risk of overdose and adverse effects. On the other hand, the potential abuse of these drugs by the population has contributed to the increase in suicide cases, which has particular interest in forensic toxicology.

In this work, a novel sensitive, fast and accurate method based on microextraction by packed sorbent (MEPS) combined with an ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) coupled to a photodiode array detector (PDA) is proposed for simultaneous determination of fluoxetine and clomipramine and their active metabolites, norfluoxetine and desmethylclomipramine respectively, in human urine. Important factors affecting the performance of MEPS such as the type of sorbent material, number of extraction cycles and sample volume were studied.

### EXPERIMENTAL

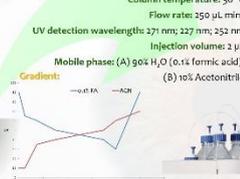
#### MEPS Analytical Procedure

- Conditioning**  
250 µL MeOH:ACN (20:20) + 250 µL H<sub>2</sub>O (pH 5.0 formic acid)
- Sampling**  
5 × 500 µL of urine sample
- Washing**  
250 µL H<sub>2</sub>O (pH 5.0 formic acid) → H<sub>2</sub>O:MeOH (9:1:1)
- Elution**  
2 × 100 µL MeOH:ACN (80:20)

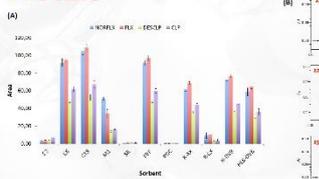
#### UHPLC-PDA Conditions

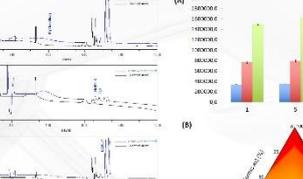
Column: ACQUITY UPLC® HSS T3 (100 × 2.1 mm; 1.8 µm, particle size)  
 Column temperature: 30 °C  
 Flow rate: 350 µL min<sup>-1</sup>  
 UV detection wavelengths: 271 nm; 227 nm; 252 nm  
 Injection volume: 2 µL  
 Mobile phase: (A) 90:10 H<sub>2</sub>O (0.1% formic acid); (B) 10:90 Acetonitrile

**Gradient:**



### RESULTS





### CONCLUSIONS

- Eleven sorbents were tested to investigate the best MEPS performance. According to the obtained results, C18 sorbent showed to be the most adequate to isolate the target metabolites.
- MEPS extraction efficiency increased using 5 × 500 µL of human urine sample at pH 5.0 and 2 × 100 µL of a methanol and acetonitrile (80:20) solution as elution step.
- The method will be validated for determination of the antidepressants fluoxetine and clomipramine as well as their active metabolites norfluoxetine and desmethylclomipramine, in human urine.
- According to the results, MEPS could be applied to the analysis of these drugs in other matrices, as well as the analysis of other therapeutic drugs due to the rapid, easy and minimum cost of analysis.

### Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support from the Portuguese Government (Project PT2014-01-116974904) and the MN Portuguese Network (RN141508R-VTAC1055).

38<sup>th</sup> International Symposium on Capillary Chromatography and 9<sup>th</sup> GCxGC Symposium, 18-23 May, 2014, Riva del Garda, Italy

⇒ E como comunicação oral, "Simultaneous determination of antidepressants and its metabolites in human urine samples: A comparison of MEPS and QuEChERS methods" apresentada no CQM Annual Meeting na Madeira que se realizou a 30-31 Janeiro de 2015.

O presente trabalho encontra-se em processo de análise após submissão para publicação na revista *Journal of Chromatography A*:

*“An improved analytical strategy combining microextraction by packed sorbent combined with ultra high pressure liquid chromatography for the determination of fluoxetine, clomipramine and their active metabolites in human urine”.*

**Vera Alves;** João Gonçalves; Carlota Fernandes; Helena Teixeira; José S. Câmara

### **Abstract**

A powerful and sensitive method, based on a miniaturized extraction technique, the microextraction by packed sorbent (MEPS), followed by ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) separation combined with a photodiode array (PDA) detection, has been developed and validated for the simultaneous determination of fluoxetine and clomipramine, and their active metabolites in human urine samples. The MEPS variables, such as sample volume, pH, number of extraction cycles (draw–eject), and desorption conditions (solvent and solvent volume of elution) that influenced the MEPS performance, were optimized. The extraction conditions were carried out using a C18 sorbent and small sample volumes (500  $\mu\text{L}$ ) in five extraction cycles and in a short time period (5 min for the entire sample preparation step).

The spiked urine samples were eluted by  $2 \times 500 \mu\text{L}$  of the mixture 80% methanol and 20% acetonitrile, and the separation was carried out on a HSS T3 analytical column (100 mm  $\times$  2.1 mm, 1.8  $\mu\text{m}$  particle size) using a binary mobile phase composed of aqueous 0.1% formic acid (eluent A) and acetonitrile (eluent B) in the gradient elution mode (10 min of total analysis).

Good linearity was obtained for all antidepressants with the correlation coefficients ( $R^2$ ) above 0.996. The limits of detection (LOD) for all antidepressants ranged from 0.068 to 0.087  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in urine. The recoveries were from 93% to 98%, with relative standard deviations less than 6%.

On the basis of analytical validation, it is shown that the MEPS/UHPLC–PDA methodology proves to be an improved, reliable, and ultra-fast approach for antidepressants analysis.

**Keywords:** Antidepressants; Microextraction by packed sorbent (MEPS), Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC), Human urine samples.



# ÍNDICE

<b>Resumo</b> .....	vii
<b>Abstract</b> .....	ix
<b>Trabalhos científicos</b> .....	xi
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	xix
<b>Índice de Tabelas</b> .....	xxiii
<b>Índice de Figuras</b> .....	xxvi
<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO</b> .....	31
<b>1.1. DEPRESSÃO</b> .....	31
<b>1.2. HISTÓRIA E EVOLUÇÃO DOS ANTIDEPRESSIVOS</b> .....	32
<b>1.3. CONSUMO DE ANTIDEPRESSIVOS EM PORTUGAL</b> .....	35
<b>1.4. CLASSIFICAÇÃO DOS ANTIDEPRESSIVOS</b> .....	36
<b>1.4.1. Inibidores Seletivos da Recaptação de Aminas</b> .....	38
<b>1.4.2. Inibidores da Monoamina-Oxidase</b> .....	38
<b>1.4.3. Antagonistas dos Recetores Monoaminérgicos</b> .....	39
<b>1.5. ANTIDEPRESSIVOS SELECIONADOS PARA A REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO</b> .....	39
<b>1.5.1. Fluoxetina</b> .....	40
<b>1.5.1.1. Propriedades físico-químicas</b> .....	40
<b>1.5.1.2. Farmacodinâmica e Farmacocinética</b> .....	42
<b>1.5.1.3. Efeitos adversos e interações medicamentosas</b> .....	45
<b>1.5.2. Clomipramina</b> .....	46
<b>1.5.2.1 Propriedades físico-químicas</b> .....	46
<b>1.5.2.2. Farmacodinâmica e Farmacocinética</b> .....	47
<b>1.5.2.3. Efeitos adversos e Interações medicamentosas</b> .....	51
<b>1.6. MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DE FÁRMACOS</b> .....	51
<b>1.7. IMPORTÂNCIA MÉDICO-LEGAL DO ESTUDO DE ANTIDEPRESSIVOS</b> .....	53
<b>CAPÍTULO II - DETERMINAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS EM MATRIZES BIOLÓGICAS</b> .....	57
<b>2.1. MATRIZES BIOLÓGICAS</b> .....	57
<b>2.2. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO</b> .....	58
<b>2.2.1. Extração Líquido – Líquido (LLE)</b> .....	59
<b>2.2.1.1. Extração de antidepressivos por LLE</b> .....	60

2.2.2. Extração em Fase Sólida (SPE).....	60
2.2.2.1. Extração de antidepressivos por SPE.....	64
2.2.3. Microextração por sorvente empacotado (MEPS).....	65
2.2.3.1. Extração de antidepressivos por MEPS .....	71
2.2.4. QuEChERS ( <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i> ) .....	73
2.2.4.1. Extração de antidepressivos por QuEChERS.....	76
2.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA.....	78
2.3.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	78
2.3.1.1. Mecanismos de separação e fases estacionárias .....	80
2.3.1.2. Detetores .....	82
2.3.2. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC) .....	84
<b>CAPÍTULO III – OBJETIVO DO TRABALHO .....</b>	<b>91</b>
3.1. JUSTIFICAÇÃO DO TEMA E OBJETIVO DO ESTUDO .....	91
<b>CAPÍTULO IV - PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>95</b>
4.1. PADRÕES E REAGENTES .....	95
4.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS .....	95
4.3. PREPARAÇÃO DE PADRÕES, SOLVENTES E SOLUÇÕES .....	96
4.4. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE URINA.....	97
4.5. METODOLOGIA ANALÍTICA .....	98
4.5.1. Processo de Extração MEPS .....	98
4.5.1.1. Procedimento de Extração MEPS Otimizado .....	98
4.5.2. Processo de Extração QuEChERS.....	99
4.5.2.1. Procedimento de Extração QuEChERS Otimizado.....	100
4.5.3. Condições Cromatográficas.....	101
4.6. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS.....	102
4.6.1. Seletividade .....	102
4.6.2. Linearidade .....	103
4.6.2.1. Padronização .....	104
4.6.3. Limites de Detecção e Quantificação.....	107
4.6.4. Precisão .....	108
4.6.5. Exatidão .....	110
4.6.6. Eficiência de Extração.....	112

4.6.7. Efeito de matriz .....	113
<b>CAPÍTULO V - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	117
5.1. Otimização das Condições Cromatográficas.....	117
5.2. Otimização do Procedimento de Extração por MEPS.....	120
5.2.1. Natureza do sorvente .....	121
5.2.2. Influência do número de ciclos de extração e volume de amostra .....	122
5.2.3. Influência do pH da amostra .....	123
5.2.4. Influência da lavagem.....	125
5.2.5. Efeito do solvente e do volume de eluição .....	126
5.2. Validação do Método Analítico para a Análise de Antidepressivos por MEPS/UHPLC-PDA .....	130
5.2.1. Seletividade .....	130
5.2.2. Linearidade .....	131
5.2.3. Limites de Detecção e Quantificação.....	133
5.2.4. Precisão e Exatidão.....	135
5.2.5. Eficiência de extração.....	138
5.3. Otimização do Procedimento de Extração por QUECHERS .....	139
5.3.1. Volume de amostra .....	140
5.3.2. Escolha do solvente de extração .....	141
5.3.3. Efeito <i>salting out</i> .....	143
5.3.4. Influência do <i>clean up</i> .....	145
5.4. Validação do Método Analítico para a Análise de Antidepressivos por QUECHERS/UHPLC-PDA .....	147
5.4.1. Seletividade .....	147
5.4.2. Linearidade .....	148
5.4.3. Limites de Detecção e Quantificação.....	150
5.4.4. Precisão e Exatidão.....	151
5.4.5. Eficiência de extração.....	154
5.5. Aplicação de ambas as metodologias, MEPS/UHPLC-PDA e QuEChERS/UHPLC-PDA, a amostras reais. ....	155
<b>CAPÍTULO VI – Conclusões</b> .....	163
<b>CAPÍTULO VII – Bibliografia</b> .....	167
<b>CAPÍTULO VIII- anexos</b> .....	183



## Lista de Abreviaturas

ACH	Acetilcolina
ACN	Acetonitrilo
ADs	Antidepressivos
ANOVA	<i>Analysis Of Variance</i> - Análise de Variâncias
BIN	<i>Barrel Insert and Needle Assembly</i>
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CLP	Clomipramina
CQM	Centro de Química da Madeira
CV	Coefficiente de Variação
CYP450	<i>Cytochrome P450</i> – Citocromo P450
C <sub>2</sub>	Etilsilano
C <sub>8</sub>	Octilsilano
C <sub>18</sub>	Octadecilsilano
DA	Dopamina
DAD	<i>Diode Array Detector</i> – Detetor de díodos
DDD	Dose Diária Definida
DESCLP	Desmetilclomipramina
DHD	Dose Diária Definida por 1000 Habitantes por dia
DLLME	<i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i> – Microextração líquido-líquido dispersiva
DS <sup>2</sup>	Diferença de variâncias
dSPE	<i>dispersive Solid Phase Extraction</i> – Extração em fase sólida dispersiva
DVB	<i>Divinylbenzene</i> – Divinilbenzeno
EME	<i>Electro Membrane Extraction</i> – Extração por eletromembrana
EMR	Erro Médio Relativo
EtAc	<i>Ethyl Acetate</i> – Acetato de etilo
F <sub>crit</sub>	Valor tabelado da distribuição F de Snedecor para (N-1;N-1;α)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLX	Fluoxetina
FMUC	Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
GCB	<i>Graphitised Carbon Black</i> – Carbono grafitizado negro
GC-FID	<i>Gas Chromatography - Flame Ionization Detector</i> – Cromatografia gasosa acoplada ao detetor de ionização de chama
GC-MS	<i>Gas Chromatography - Mass Spectrometry</i> – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
H-DVB	<i>Highly cross-linked polystyrene Divinylbenzene</i>
HF-LPME	<i>Hollow Fiber-Based Liquid-Phase Microextraction</i> – Microextração de fase líquida baseada em fibra oca
HL	<i>High Level</i> – Nível alto
HLB	<i>Reverse phase capability, Hydrophilic – Lipophilic Balance</i>
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> – Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-DAD	<i>High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection</i> – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detetor de díodos

HPLC-FD	<i>High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection</i> – Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência
HPLC-UV	<i>High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet</i> – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao ultravioleta
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IMAO	Inibidores da Monoamina-Oxidase
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.
ISJD	Casa de Saúde S. João de Deus do Funchal
ISRS	Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina
ISRN	Inibidores Seletivos da Recaptação da Noradrenalina
ISRSN	Inibidores seletivos da recaptação da Serotonina e da Noradrenalina
ISRND	Inibidores seletivos da recaptação da Noradrenalina e da Dopamina
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IV	Infravermelho
LC	<i>Liquid Chromatography</i> - Cromatografia líquida
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry</i> – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem
LC-qTOF-MS	<i>Liquid Chromatography – quadrupole Time of Flight - Mass Spectrometry</i> – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa com híbrido quadrupolo de tempo de voo
LC-UV	<i>Liquid Chromatography with Ultraviolet</i> – Cromatografia líquida acoplada ao ultravioleta
LL	<i>Low Level</i> – nível baixo
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> – Extração líquido-líquido
LOD	<i>Limit Of Detection</i> – Limite de detecção
LLOQ	<i>Lower Limit Of Quantification</i> – Limite inferior de quantificação
MAO	<i>Monoamine Oxidase</i> – Monoamina Oxidase
MEPS	<i>Microextraction by packed sorbent</i> - microextração por sorvente empacotado
MeOH	<i>Methanol</i> - metanol
MIPs	<i>Molecular Imprinting Polymers</i> – Polímeros de impressão molecular
ML	<i>Medium Level</i> – Nível médio
M <sub>1</sub>	<i>Mixed Mode</i> – Fase mista
MS	<i>Mass Spectrometry</i> – Espetrometria de massa
NA	Noradrenalina
NORFLX	Norfluoxetina
NT	Neurotransmissores
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDA	<i>Photo Diode Array</i> - Detetor de fotodiodos
PEP	<i>Polar Enhanced Polymer</i> - Polímero polar reforçado e altamente poroso
PGC	<i>Porous Graphitic Carbon</i> – Polímero de carbono grafítico poroso
PI	Padrão Interno
PPT	Precipitação de Proteínas
PSA	<i>Primary Secondary Amine</i> – Amina primária secundária
PS-DVB	<i>Polystyrene Divinylbenzene</i> - Poliestireno de divinilbenzeno
QuEChERS	<i>Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe</i> – “rápido fácil barato eficaz robusto seguro”
R	Coeficiente de correlação

$R^2$	Coeficiente de determinação
R-AX	<i>Retain Anionic Exchange</i> – poliestireno-divinilbenzeno parcialmente funcionalizado com grupos de ácido sulfónico
R-CX	<i>Retain Cationic Exchange</i> – poliestireno-divinilbenzeno parcialmente funcionalizado com grupos de amina quaternários
Relacre	Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i> – Coeficiente de variação ou desvio padrão relativo
RT	<i>Retention Time</i> – Tempo de retenção
s	Desvio padrão
SAX	<i>Strong Anionic Exchange</i> – troca aniónica forte
SCX	<i>Strong Cationic Exchange</i> – troca catiónica forte
S-DVB	<i>Styrene Divinylbenzene</i> – Estireno de divinilbenzeno
SIL	<i>Silica based</i> – Sílica
SNC	Sistema Nervoso Central
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> – Extração em fase sólida
SPME	<i>Solid Phase MicroExtraction</i> – Microextração em fase sólida
$S_{y/x}$	Desvio padrão residual
TCA	<i>Tricyclic Antidepressants</i> - Antidepressivos Tricíclicos
TDM	<i>Therapeutic Drug Monitoring</i> - Monitorização terapêutica medicamentosa
$t_{1/2}$	Tempo de semi-vida
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> - Cromatografia líquida de ultra eficiência
UHPLC-PDA	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography – PhotoDiode Array</i> - Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao detetor de fotodiodos
UPLC-MS/MS	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry</i> – Cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massa em tandem
UPLC-TOF-MS	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography - Time of Flight - Mass Spectrometry</i> – Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa com tempo de voo
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
5-HT	Serotonina
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda máximo



## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Algumas Propriedades Físico-Químicas da FLX e NORFLX <sup>[49]</sup> . .....	41
<b>Tabela 2.</b> Algumas propriedades físico-químicas da CLP e DESCLP <sup>[49, 55]</sup> . .....	47
<b>Tabela 3.</b> Doses terapêuticas, dose tóxica e dose letal de FLX e NORFLX em sangue <sup>[37, 88, 89]</sup> . .....	53
<b>Tabela 4.</b> Propriedades dos sorventes MEPS. ....	68
<b>Tabela 5.</b> Comprimento de onda dos solventes mais utilizados. ....	83
<b>Tabela 6.</b> Métodos analíticos para a determinação dos ADs em estudo em fluidos biológicos. ....	88
<b>Tabela 7.</b> Tabela ANOVA (fator único) <sup>[227, 228]</sup> . ....	109
<b>Tabela 8.</b> Cálculo das estimativas das variâncias para o modelo experimental utilizado no estudo da repetibilidade e precisão intermédia <sup>[227, 228]</sup> . ....	110
<b>Tabela 9.</b> Condições testadas para a otimização da fase móvel para análise dos ADs em estudo por UHPLC-PDA. ....	118
<b>Tabela 10.</b> Condições experimentais iniciais do procedimento MEPS. ....	120
<b>Tabela 11.</b> Condições experimentais testadas no processo de lavagem da MEPS. ....	125
<b>Tabela 12.</b> Eluentes testados no passo da eluição da MEPS. ....	126
<b>Tabela 13.</b> Condições experimentais otimizadas da MEPS. ....	129
<b>Tabela 14.</b> Tempos de retenção e comprimentos de onda máximo dos ADs em estudo e do PI. ....	130
<b>Tabela 15.</b> Resumo dos resultados obtidos relativos ao modelo de regressão linear para os ADs em estudo por MEPS/UHPLC-PDA. ....	132
<b>Tabela 16.</b> Resumo dos resultados obtidos no teste de Mandel para os ADs em estudo por MEPS/UHPLC-PDA. ....	133
<b>Tabela 17.</b> Valores de LOD e LOQ calculados para cada antidepressivo em estudo por MEPS/UHPLC-PDA. ....	134
<b>Tabela 18.</b> Resumo dos resultados obtidos no estudo da repetibilidade do método, para cada um dos compostos em estudo, calculados para três níveis de concentração por MEPS/UHPLC-PDA. ....	136

<b>Tabela 19.</b> Resumo dos resultados obtidos no estudo da precisão e exatidão do método, para cada um dos compostos em estudo, calculados para três níveis de concentração por MEPS/UHPLC-PDA. ....	137
<b>Tabela 20.</b> Resumo dos resultados obtidos no teste de hipóteses (teste <i>t-Student</i> ) para o estudo dos erros sistemáticos associados à recuperação do método por MEPS/UHPLC-PDA.....	138
<b>Tabela 21.</b> Resultados da determinação da eficiência de extração por MEPS para três níveis de concentração. ....	138
<b>Tabela 22.</b> Condições experimentais otimizadas da MEPS. ....	139
<b>Tabela 23.</b> Solventes testados no processo de extração por QuEChERS. ....	141
<b>Tabela 24.</b> Testes realizados para avaliar o efeito de <i>salting out</i> . ....	143
<b>Tabela 25.</b> Composição tubos <i>clean up</i> DisQuE™ testados. ....	145
<b>Tabela 26.</b> Condições experimentais otimizadas do QuEChERS. ....	147
<b>Tabela 27.</b> Resumo dos resultados obtidos relativos ao modelo de regressão linear para os ADs em estudo por QuEChERS/UHPLC-PDA. ....	149
<b>Tabela 28.</b> Resumo dos resultados obtidos relativos ao modelo de regressão linear para os ADs em estudo por QuEChERS/UHPLC-PDA. ....	150
<b>Tabela 29.</b> Valores de LOD e LOQ calculados para cada antidepressivo em estudo. ...	150
<b>Tabela 30.</b> Resumo dos resultados obtidos no estudo da repetibilidade do método, para cada um dos compostos em estudo, calculados para três níveis de concentração por QuEChERS/UHPLC-PDA. ....	152
<b>Tabela 31.</b> Resumo dos resultados obtidos no estudo da precisão e exatidão do método, para cada um dos compostos em estudo, calculados para três níveis de concentração por QuEChERS /UHPLC-PDA.....	153
<b>Tabela 32.</b> Resumo dos resultados obtidos no teste de hipóteses (teste <i>t-Student</i> ) para o estudo dos erros sistemáticos associados à recuperação do método por QuEChERS/UHPLC-PDA. ....	154
<b>Tabela 33.</b> Resultados da determinação da eficiência de extração por QuEChERS para três níveis de concentração. ....	155
<b>Tabela 34.</b> Informação das amostras dos pacientes. ....	156
<b>Tabela 35.</b> Concentrações obtidas das amostras dos pacientes através do método MEPS/UHPLC-PDA.....	156

<b>Tabela 36.</b> Concentrações obtidas das amostras dos pacientes através do método QuEChERS/UHPLC-PDA .....	157
<b>Tabela 37.</b> Resultados estatísticos da precisão intermédia para a fluoxetina. ....	188
<b>Tabela 38.</b> Resultados estatísticos da precisão intermédia para a norfluoxetina. ....	189
<b>Tabela 39.</b> Resultados estatísticos da precisão intermédia para a clomipramina. ....	190
<b>Tabela 40.</b> Resultados estatísticos da precisão intermédia para a desmetilclomipramina. ....	191
<b>Tabela 41.</b> Resultados estatísticos da exatidão para a fluoxetina. ....	192
<b>Tabela 42.</b> Resultados estatísticos da exatidão para a norfluoxetina. ....	193
<b>Tabela 43.</b> Resultados estatísticos da exatidão para a clomipramina. ....	194
<b>Tabela 44.</b> Resultados estatísticos da exatidão para a desmetilclomipramina. ....	195
<b>Tabela 45.</b> Resultados estatísticos da precisão intermédia para a fluoxetina. ....	200
<b>Tabela 46.</b> Resultados estatísticos da precisão intermédia para a norfluoxetina. ....	201
<b>Tabela 47.</b> Resultados estatísticos da precisão intermédia para a clomipramina. ....	202
<b>Tabela 48.</b> Resultados estatísticos da precisão intermédia para a desmetilclomipramina. ....	203
<b>Tabela 49.</b> Resultados estatísticos da exatidão para a fluoxetina. ....	204
<b>Tabela 50.</b> Resultados estatísticos da exatidão para a norfluoxetina. ....	205
<b>Tabela 51.</b> Resultados estatísticos da exatidão para a clomipramina. ....	206
<b>Tabela 52.</b> Resultados estatísticos da exatidão para a desmetilclomipramina. ....	207

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Visão geral sobre o desenvolvimento e evolução dos ADs durante o século XX. (Adaptado de <sup>[16]</sup> ). .....	34
<b>Figura 2.</b> Evolução dos Medicamentos Psicofármacos (DDD por 1000 habitantes dia), por subgrupo Terapêutico entre 2000 e 2012 (adaptado de <sup>[23]</sup> ). .....	35
<b>Figura 3.</b> Classificação dos ADs segundo o mecanismo de ação mais provável. (Adaptado de <sup>[28]</sup> ). .....	37
<b>Figura 4.</b> Estrutura química dos enantiômeros da FLX. ....	40
<b>Figura 5.</b> Estrutura química da FLX e NORFLX. ....	41
<b>Figura 6.</b> Mecanismo de ação dos SSRI (adaptado de <sup>[51]</sup> ). ....	42
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática do metabolismo da FLX. ....	44
<b>Figura 8.</b> Estrutura química da CLP e da DESCLP. ....	46
<b>Figura 9.</b> Mecanismo de ação dos TCA (adaptado de <sup>[65]</sup> ). .....	48
<b>Figura 10.</b> Representação esquemática do metabolismo da CLP (adaptado de <sup>[45]</sup> ). .....	50
<b>Figura 11.</b> Representação esquemática do procedimento SPE. ....	63
<b>Figura 12.</b> A - Microseringa MEPS e sorvente C <sub>18</sub> . B - Visão geral de um sorvente da MEPS (adaptado de <sup>[107]</sup> ). .....	66
<b>Figura 13.</b> Representação esquemática das diferentes etapas no processo MEPS. ....	69
<b>Figura 14.</b> Evolução do formato MEPS (adaptado de <sup>[140]</sup> ). .....	70
<b>Figura 15.</b> Representação esquemática das diferentes etapas no processo QuEChERS (adaptado de <sup>[157]</sup> ). .....	74
<b>Figura 16.</b> Esquema representativo de um equipamento básico para HPLC (adaptado de <sup>[119]</sup> ). .....	79
<b>Figura 17.</b> Esquema representativo de um UHPLC. ....	85
<b>Figura 18.</b> Esquema do procedimento MEPS otimizado com recurso à eVol <sup>®</sup> . ....	99
<b>Figura 19.</b> Esquema da metodologia QuEChERS modificado e otimizado. ....	100
<b>Figura 20.</b> Gradiente de fase móvel do UHPLC-PDA usado na separação das substâncias em estudo. ....	101
<b>Figura 21.</b> Cromatograma obtido com as melhores condições cromatográficas nos comprimentos de onda máximo de cada analito. (1-NORFLX; 2-FLX; 3-DESCLP; 4-CLP; Píclozapina). .....	119

<b>Figura 22.</b> Comparação da eficiência de extração dos diferentes sorventes MEPS para cada antidepressivo.....	121
<b>Figura 23.</b> Influência do número de ciclos de extração e volume de amostra. ....	123
<b>Figura 24.</b> Estudo do efeito do pH na eficiência de extração da MEPS.....	124
<b>Figura 25.</b> Gráfico ternário do sistema de solventes de eluição (evidenciado pela marcação a azul) obtido pelo <i>software</i> OriginLab® 9.0.....	127
<b>Figura 26.</b> Influência do volume de eluição na performance da MEPS.....	128
<b>Figura 27.</b> Somatório das áreas de todos os analitos obtidas da injeção do extrato da etapa do condicionamento após a eluição.....	129
<b>Figura 28.</b> Comparação dos cromatogramas de amostra de urina branca com os cromatogramas de urina fortificada com os analitos em estudo a diferentes comprimentos de onda após extração por MEPS (C = 2,5 µg/mL); (A) 227 nm e (B) 252 nm. (1 – NORFLX; 2 – FLX; 3 – DESCLP; 4 – CLP; PI – padrão interno – clozapina).....	131
<b>Figura 29.</b> Curvas de calibração obtidas para cada antidepressivo.....	132
<b>Figura 30.</b> Influência do volume de amostra no processo de extração por QuEChERS..	140
<b>Figura 31.</b> Gráfico ternário do sistema de solventes de extração (evidenciado pela marcação a azul) obtido pelo <i>software</i> OriginLab® 9.0.....	142
<b>Figura 32.</b> Efeito do <i>salting out</i> na etapa de extração/ partição do QuEChERS.....	144
<b>Figura 33.</b> Influência da etapa do <i>clean up</i> na eficiência de extração por QuEChERS. ...	146
<b>Figura 34.</b> Comparação dos cromatogramas de amostra de urina branca com os cromatogramas de urina fortificada com os analitos em estudo a diferentes comprimentos de onda após extração por QuEChERS (C = 2,5 µg/mL); (A) 227 nm e (B) 252 nm. (1 – NORFLX; 2 – FLX; 3 – DESCLP; 4 – CLP; PI – padrão interno – clozapina).....	148
<b>Figura 35.</b> Curvas de calibração obtidas para cada antidepressivo.....	149
<b>Figura 36.</b> Cromatogramas obtidos das amostras de urina dos pacientes 1 e 4 por: (A)- MEPS/UHPLC-PDA e (B) – QuEChERS/UHPLC-PDA. ....	158



# **CAPÍTULO I**

## **1. INTRODUÇÃO**



## CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

### 1.1. DEPRESSÃO

Desde a antiguidade que se registam casos de pessoas com alterações emocionais que se revelaram como transtornos psíquicos. Durante a Grécia antiga, Hipócrates, apelidado de "pai da medicina", popularizou a crença de que a depressão, assim como todas as outras doenças, era causada por um desequilíbrio nos "humores" ou quatro fluidos corporais (sangue, bílis negra, bílis amarela e fleuma), substâncias produzidas pelo corpo e que acreditavam regular todas as funções corporais <sup>[1]</sup>. Atualmente, a depressão é ainda considerada como uma das principais formas de manifestação do sofrimento psíquico, uma vez que afeta cerca de 350 milhões de pessoas a nível mundial<sup>[2, 3]</sup>.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a depressão ou transtorno depressivo pode ser definido como um transtorno mental comum, caracterizado por tristeza, perda de interesse ou prazer, diminuição da energia, oscilações entre sentimentos de culpa e baixa autoestima, além de distúrbios do sono ou do apetite. Sintomas de ansiedade, sensação de cansaço e falta de concentração são, também, muito comuns num paciente depressivo e não sendo tratado pode levar ao aumento da taxa de morbidade e mortalidade, devido a eventuais tendências suicidas <sup>[3-5]</sup>.

A depressão manifesta-se de forma diferente de pessoa para pessoa, e em alguns casos os sintomas emocionais são mais evidentes, enquanto noutros a doença se manifesta mais fisicamente <sup>[6]</sup>. Esta possui maior incidência nas mulheres do que nos homens, prevendo-se que em 2020, tendo em conta todos os géneros e idades, seja a segunda principal causa de incapacidade na taxa de doença global <sup>[7, 8]</sup>.

Esta patologia constitui um importante problema de saúde devido à sua frequência, assim como repercussão a nível físico, psicológico, social, laboral e até económico <sup>[8]</sup>.

Um paciente depressivo pode ter crises episódicas, recorrentes ou crónicas, levando à diminuição da capacidade do indivíduo em assegurar, por vezes, as tarefas e responsabilidades mais simples do dia-a-dia. Os sintomas tendem a persistir durante longos períodos de tempo, dificultando, significativamente, tanto a nível pessoal como a nível profissional <sup>[9]</sup>.

Esta perturbação mental resulta da alteração ou disfunção dos níveis de neurotransmissores (NT) no hipotálamo, tais como a dopamina (DA), a serotonina (5-HT) e a noradrenalina (NA). A doença é apenas diagnosticada clinicamente por observação médica, uma vez que não existem exames laboratoriais ou imagiológicos que possam indiciar a mesma. O diagnóstico pode passar despercebido durante muito tempo e evoluir para estados muito graves e a falta de tratamento adequado pode levar a um nível crónico [9, 10].

O tratamento da depressão tem como objetivo eliminar ou reduzir os sintomas, de modo a minimizar os efeitos adversos. Após a adesão ao regime terapêutico há mais facilidade em retornar a um nível de funcionamento pré-morbilidade, evitando assim episódios adicionais da doença [11].

Normalmente, este tratamento depressivo é realizado através de medicamentos, de intervenções psicoterapêuticas, ou então utilizando a conjugação de ambas [12]. A psicoterapia é particularmente útil quando o caso depressivo é mais ligeiro e reativo às adversidades da vida, podendo ser associada com a administração dos medicamentos nos casos moderados a graves [9].

Os medicamentos usados no tratamento das depressões são os antidepressivos (ADs). Estes medicamentos têm demonstrado eficácia no controlo sintomático de determinadas perturbações mentais, apresentando-se como um grupo terapêutico excepcionalmente importante no tratamento de transtornos depressivos, de ansiedade, de pânico, obsessivo-compulsivo, alimentares, entre outros [13]. Efetivamente, com a evolução da ciência e da farmacologia, os ADs são cada vez mais eficazes no controlo e tratamento da depressão, como resultado, encontram-se entre as classes de medicamentos mais frequentemente prescritas [8, 9].

### **1.2. HISTÓRIA E EVOLUÇÃO DOS ANTIDEPRESSIVOS**

Os ADs são fármacos que se encontram inseridos no grupo das substâncias psicotrópicas. Os psicofármacos ou agentes psicotrópicos são substâncias químicas cujo desenvolvimento, a partir da década de 50, marcou uma das revoluções terapêuticas na área da saúde mental [8]. Antes de 1950, o tratamento somático da depressão consistia em diferentes terapias. Inicialmente os opiáceos e as anfetaminas eram comumente

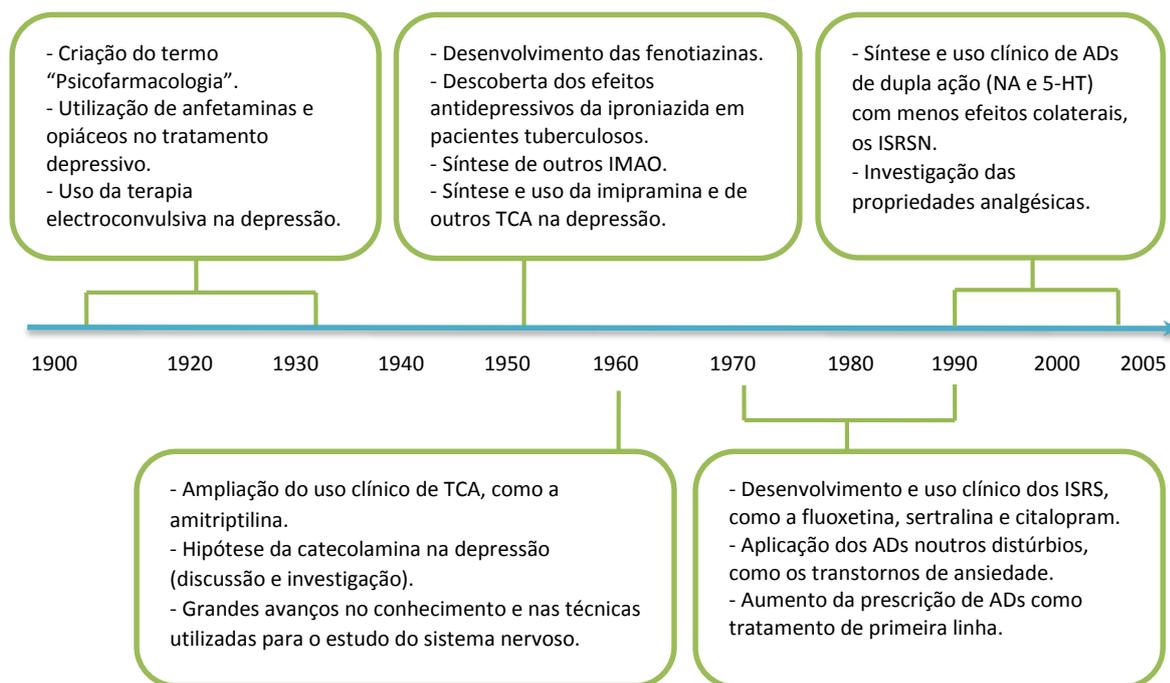
usados como ADs devido ao aumento de energia e de atividade, porém, revelaram-se ineficazes no tratamento da depressão, sendo o seu uso banido mais tarde, devido à sua natureza viciante e respectivos efeitos colaterais [14, 15]. No final dos anos 30, a eletroconvulsoterapia surgiu como outra opção ao tratamento depressivo, e apesar de eficaz, este tipo de terapia era visto na altura como um tratamento perigoso e assustador [15].

No final da década de 50, surgem então os primeiros fármacos ADs, a imipramina e a iproniazida, de famílias farmacológicas distintas: os antidepressivos tricíclicos (TCA) e os inibidores da monoamina-oxidase (IMAO), respetivamente [16, 17]. A sua descoberta accidental, no decurso de estudos de outras patologias como a tuberculose ou a esquizofrenia, e a utilização na prática clínica foram um passo determinante no tratamento depressivo, uma vez que começou a ser possível tratar os doentes e o transtorno mental passou a ser encarado como uma patologia tratável [18].

Nos anos seguintes à descoberta inicial, despoletou-se um grande interesse no desenvolvimento da terapia farmacológica, consistindo a investigação clínica no elucidar de algumas anomalias biológicas da depressão, em encontrar outras aplicações dos ADs, nomeadamente no tratamento de outros transtornos e no desenvolvimento de outros ADs com estrutura química semelhante à da imipramina e da iproniazida [1, 15].

Contudo, e apesar da eficácia e dos grandes avanços no tratamento de doentes depressivos, estes fármacos apresentavam efeitos colaterais indesejáveis causados pela inespecificidade da sua ação farmacológica, sendo potencialmente letais em casos de sobredosagem [16, 19]. Posto isto, no início dos anos 80, fatores como os efeitos secundários, as interações medicamentosas e a toxicidade dos mesmos, associados a um grande avanço no conhecimento do sistema nervoso central, conduziram à grande revolução na síntese e formulação de novos fármacos ADs.

Os novos ADs surgem, então, nas últimas décadas (**Figura 1**) apresentando novas classes de ADs, aparentemente mais seguras e com melhor tolerância. A classificação dos ADs, assim como os diferentes tipos de mecanismos de ação, serão abordados mais à frente neste trabalho.



**Abreviaturas:** ADs – antidepressivos; IMAO – inibidor da monoamina-oxidase; NA – noradrenalina; 5-HT – serotonina; ISRSN – inibidor da recaptção de serotonina e noradrenalina; ISRS – inibidor seletivo da recaptção de serotonina; TCA – antidepressivo tricíclico.

**Figura 1.** Visão geral sobre o desenvolvimento e evolução dos ADs durante o século XX. (Adaptado de <sup>[16]</sup>).

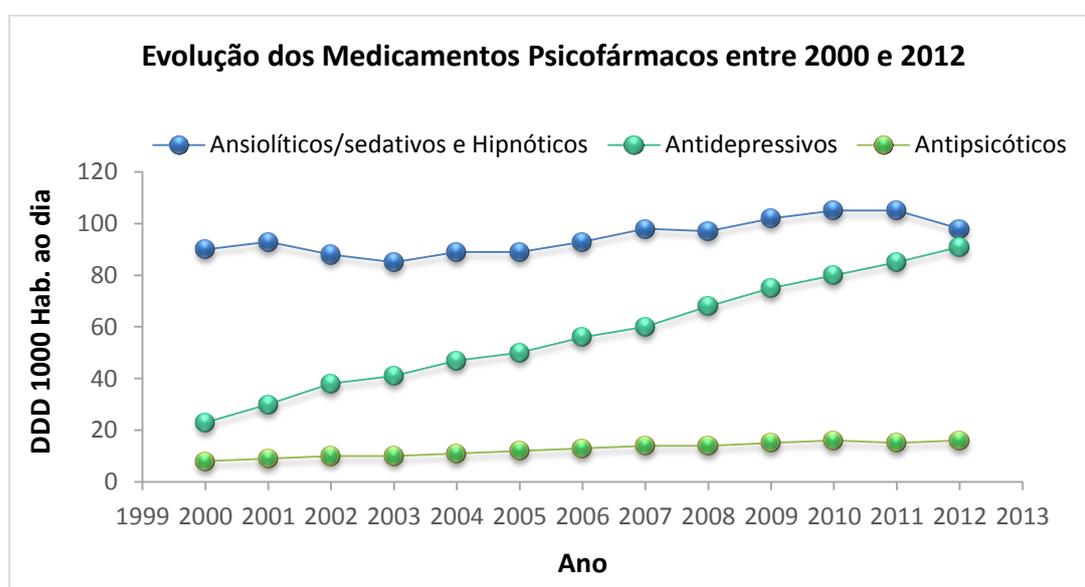
As novas classes de ADs apresentam diferentes estruturas químicas, assim como mecanismos de ação distintos, contudo, todas têm como finalidade influenciar a concentração dos NT na fenda sináptica <sup>[20]</sup>.

Assim sendo, diversos tipos de ADs foram surgindo desde os finais dos anos 80, com menores efeitos secundários, maior segurança no caso de sobredosagem e maior tolerabilidade. Porém, importa referir que tanto do ponto de vista teórico como prático a eficácia dos tratamentos disponíveis ainda é relativamente baixa. Embora os resultados da busca por uma terapia antidepressiva eficaz e rápida ainda não sejam totalmente satisfatórios, a investigação neste domínio contribuiu imensamente para o desenvolvimento da neurociência, devido às várias tentativas em formular as diversas teorias sobre a ação do fármaco antidepressivo <sup>[21]</sup>.

### 1.3. CONSUMO DE ANTIDEPRESSIVOS EM PORTUGAL

Segundo a Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P. (INFARMED) e outras organizações internacionais, o consumo de ADs em Portugal tem vindo a aumentar de forma exponencial [8, 22].

Na **Figura 2**, podemos verificar a evolução da utilização de psicofármacos em Portugal entre 2000 e 2012 em todos os subgrupos, sendo mais evidente nos ADs e antipsicóticos, expressa através da dose diária definida (DDD) por 1000 habitantes/dia. A DDD corresponde à dose média diária de manutenção do fármaco, em adultos, para a sua indicação principal, por uma determinada via de administração e expressa em quantidade de princípio ativo [23].



**Figura 2.** Evolução dos Medicamentos Psicofármacos (DDD por 1000 habitantes dia), por subgrupo Terapêutico entre 2000 e 2012 (adaptado de [23]).

O aumento dos níveis de utilização dos ADs em Portugal pode dever-se a uma utilização mais prolongada, muitas vezes para além do indicado, a novos utilizadores devido à maior acessibilidade aos medicamentos, ou ainda a introdução de novas indicações terapêuticas para as quais estes fármacos não são os mais aconselhados [23].

Se as tendências da transição demográfica e epidemiológica se mantiverem, prevê-se que a carga da depressão representará, em 2020, 5,7% da carga total de doenças, tornando-se a segunda maior causa de anos de vida perdidos por incapacidade [8, 23].

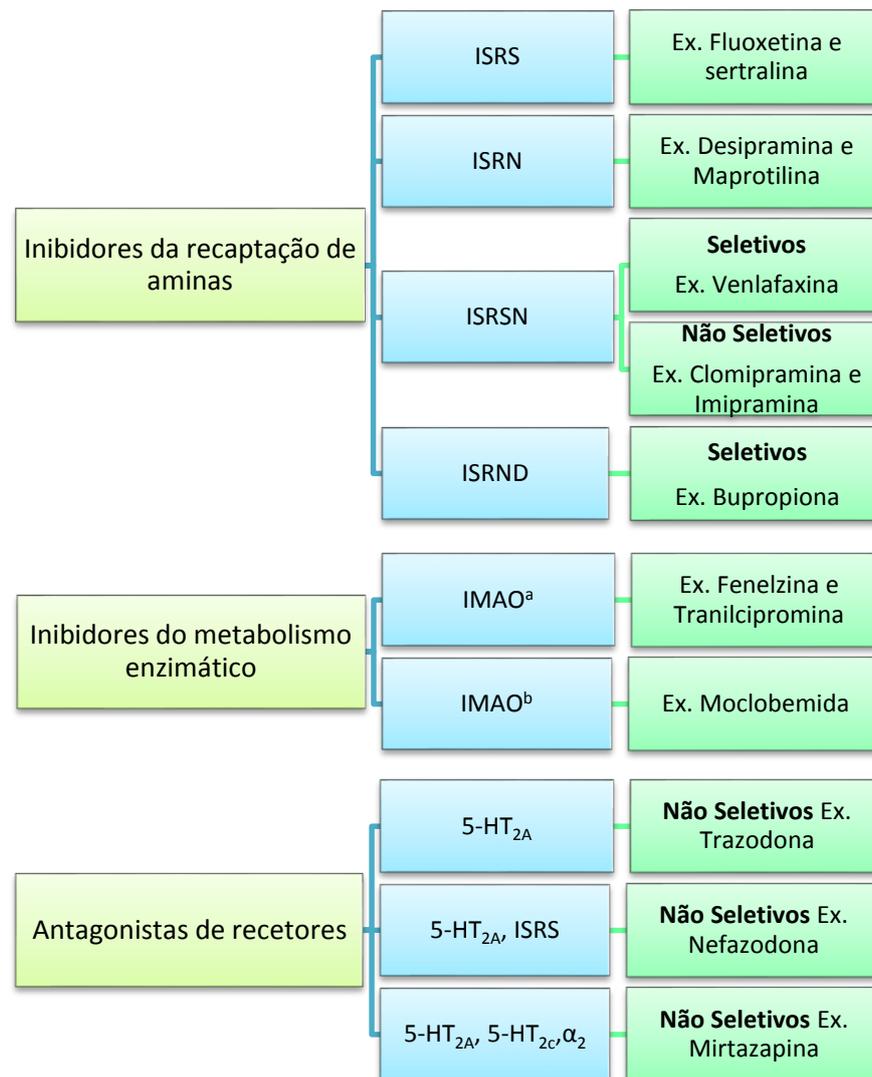
#### 1.4. CLASSIFICAÇÃO DOS ANTIDEPRESSIVOS

A descoberta dos ADs no final dos anos 50 e a sua utilização na prática clínica, permitiu um avanço no tratamento e na compreensão dos mecanismos subjacentes aos transtornos depressivos [24, 25]. A depressão tornou-se, assim, um problema médico passível de tratamento, semelhante a outras doenças, como a diabetes e a hipertensão arterial [18].

Assim, tornou-se fundamental criar um sistema de classificação que facilitasse a prática clínica na escolha do antidepressivo mais adequado, havendo, atualmente, pelo menos 35 ADs diferentes disponíveis em todo o mundo, apesar da sua disponibilidade nos mercados variar de país para país [26].

Os ADs podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química ou as suas propriedades farmacológicas. Relativamente à estrutura, temos os ADs heterocíclicos (trícíclicos e tetracíclicos), os quais possuem uma estrutura cíclica derivada do anel benzénico e os ADs cuja estrutura possui um grupo amina secundária ou terciária. Contudo, devido à grande variedade de novos ADs, e uma vez que estes não compartilham estruturas comuns, a classificação baseada na estrutura tem sido cada vez menos utilizada, sendo preferencialmente classificados em função da ação farmacológica, tornando-se mais útil na prática clínica [18].

Assim, apresenta-se uma classificação que divide este tipo de psicofármacos em três categorias principais, baseando-se no mecanismo de ação mais provável: inibidores da recaptção dos NT pela membrana sináptica, inibidores do metabolismo enzimático dos NT e antagonistas dos recetores das aminas biogénicas. Dentro de cada categoria, os ADs são ainda subdivididos de acordo com o seu grau de seletividade (**Figura 3.**) [27, 28].



**Abreviaturas:** IMAO<sup>a</sup> – inibidores da monoamina-oxidase irreversíveis e não seletivos; IMAO<sup>b</sup> – inibidores da monoamina-oxidase reversíveis e seletivos; ISRS – inibidores seletivos da recaptação de serotonina; ISRN – inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina; ISRSN – inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina; ISRND – inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina e dopamina; 5-HT<sub>2A</sub> – Antagonista do recetor 5-HT<sub>2A</sub>; 5-HT<sub>2A</sub>, ISRS – Antagonista do recetor 5-HT<sub>2A</sub> e inibidor seletivo da recaptação de serotonina; 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, α<sub>2</sub> – Antagonista combinado dos receptores 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, α<sub>2</sub>.

**Figura 3.** Classificação dos ADs segundo o mecanismo de ação mais provável. (Adaptado de [28]).

A vantagem desta classificação é que permite que as semelhanças e as diferenças entre os diferentes ADs sejam realçadas e fornece uma estrutura organizada, facilitando o trabalho do clínico e/ ou investigador na adição de novas classes de ADs [28].

#### **1.4.1. Inibidores Seletivos da Recaptação de Aminas**

Nos inibidores da recaptação de aminas, incluem-se os ADs cuja ação farmacológica incide sobre NT específicos, como é o caso dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS).

Os ISRS inibem, de forma potente e seletiva, a recaptação de 5-HT, resultando na potencialização da neurotransmissão serotoninérgica [18]. Apesar de compartilharem o mesmo mecanismo de ação, os ISRS apresentam estruturas distintas, com diferenças significativas nos perfis farmacodinâmico e farmacocinético.

O poder inibitório da recaptação da 5-HT é variado; contudo, a afinidade para com outras monoaminas, como a DA e a NA, é geralmente muito baixa [18]. Assim sendo, surgem outras classes de ADs na mesma categoria dos inibidores que possuem uma maior afinidade para os outros NT, mais precisamente os inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina (ISRN), os inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (ISRSN) e os inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina e dopamina (ISRND).

Os ISRS estão indicados para o tratamento de diversos tipos de transtornos, tais como depressivos, obsessivo-compulsivos, alimentares e transtorno do pânico, mas também são prescritos em casos de neuropatia diabética, dor de cabeça tensional crônica, entre outras patologias [6]. Quando comparados com os TCA (classificação baseada na estrutura), os ISRS têm menos efeitos adversos e menos interações medicamentosas e geralmente apresentam, para além disto, uma melhor tolerância, com eficácia antidepressiva aproximadamente equivalente [29].

#### **1.4.2. Inibidores da Monoamina-Oxidase**

Na categoria dos inibidores do metabolismo enzimático, encontram-se os IMAO. Os IMAO promovem o aumento da disponibilidade de 5-HT através da inibição da enzima monoamina oxidase (MAO). Esta é responsável pela metabolização da 5-HT e de outros NT catecolaminérgicos, tais como, NA, DA e adrenalina. Havendo uma redução da atividade da MAO, produz-se um aumento da concentração destes NT nos locais de armazenamento no SNC e no sistema nervoso simpático [18, 30].

Apesar de muito eficazes e de ainda serem utilizados no tratamento das síndromes depressivas e fobia social, estes fármacos apresentam efeitos adversos indesejáveis

causados pela inespecificidade da sua ação farmacológica, sendo potencialmente letais em casos de sobredosagem ou de interação medicamentosa [31, 32].

### 1.4.3. Antagonistas dos Recetores Monoaminérgicos

Na terceira categoria estão inseridos os ADs, cuja ação farmacológica desencadeia um efeito antagonista nos recetores monoaminérgicos.

Uma vez que este tipo de ADs não se caracteriza como ISRS, como IMAO, nem apresentam uma estrutura tricíclica, são denominados de antidepressivos atípicos [6]. Esta classe de ADs tem como função efetuar a ligação aos recetores neurológicos, sem os ativar, impedindo assim os NT que o ativariam, de se ligar [33].

Alguns destes atípicos aumentam a transmissão noradrenérgica, através do antagonismo de recetores  $\alpha_2$  (pré-sinápticos) no SNC, ao mesmo tempo que modulam a função central da 5-HT, por interação com os recetores 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub>, como é o caso da Mirtazapina [6]. Esta classe de ADs está indicada no tratamento da depressão em adultos, associada ou não a estados de ansiedade [34]. Contudo, apresentam diversos efeitos adversos e interações medicamentosas, e apesar de eficientes para o tratamento dos estados depressivos, demoram vários dias para fazer efeito e devem ser tomados por um longo período de tempo [6].

## 1.5. ANTIDEPRESSIVOS SELECIONADOS PARA A REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO

Para este trabalho, seleccionámos dois ADs para estudo, a fluoxetina e a clomipramina e os respetivos metabolitos ativos, a norfluoxetina e a desmetilclomipramina. Esta escolha teve em conta os diferentes mecanismos de ação de cada um dos fármacos, assim como o facto de serem dois dos mais prescritos na Casa de Saúde S. João de Deus do Funchal (ISJD).

Serão abordadas, de seguida, algumas propriedades a nível físico-químico destes ADs, assim como os mecanismos de ação envolvidos nestes fármacos, as propriedades farmacocinéticas e efeitos adversos causados pelos mesmos.

De modo a evitar problemas na quantificação, que podem estar relacionados com reações secundárias, com impurezas ou degradações na sua estrutura durante a aplicação do método analítico, é importante conhecer as propriedades físico-químicas dos analitos

em estudo [35]. A maioria dos fármacos psicotrópicos apresenta propriedades químicas semelhantes, como a hidrofobicidade, peso molecular relativo e a basicidade [36].

Por outro lado, dado que a dosagem e a resposta a um fármaco varia de indivíduo para indivíduo, é igualmente importante conhecer algumas das suas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas e respetivos efeitos adversos [37].

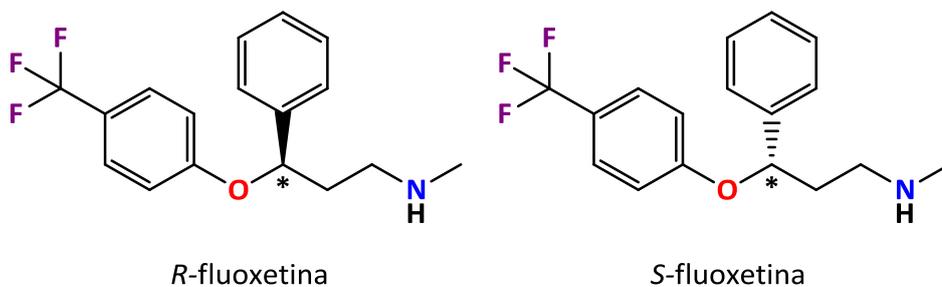
### 1.5.1. Fluoxetina

A Fluoxetina (FLX) foi descrita cientificamente, pela primeira vez, em 1974, pela empresa farmacêutica *Eli Lilly*, como um ISRS [38, 39]. Popularmente conhecida pelo seu nome comercial Prozac®, a FLX foi o segundo ISRS a ser descoberto, contrariamente ao que se pensava. Apesar de se encontrar comercializada há mais de quatro décadas, é um dos ADs mais prescritos em todo o mundo e é um dos poucos ADs aprovados para uso em crianças e adolescentes [38, 40, 41].

Atualmente, a FLX é usada, essencialmente, no tratamento de episódios depressivos, na perturbação obsessivo-compulsiva, nos casos de bulimia nervosa, assim como alguns distúrbios alimentares e ataques de pânico [42-44].

#### 1.5.1.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

A FLX é administrada como uma mistura racémica dos enantiómeros *R*- e *S*- (**Figura 4**). Ambos os isómeros são de atividade farmacológica equivalente e possuem um centro quiral; no entanto, o enantiómero *R*- é eliminado mais rapidamente e é menos potente na inibição da recaptção de 5-HT do que o enantiómero *S*-. Apesar disso, não foram encontrados benefícios reais para a sua introdução na terapêutica, como agente antidepressivo [45, 46].



**Figura 4.** Estrutura química dos enantiómeros da FLX.

Nos humanos a FLX é metabolizada no metabolito quiral e ativo, a norfluoxetina (NORFLX), cujo efeito antidepressivo é principalmente exercido pelo enantiómero *S*-, tão potente quanto a FLX [47, 48].

Relativamente à estrutura, ambas as moléculas apresentam dois anéis benzénicos, separados por um grupo éter, e um grupo hidrocarboneto halogenado composto por três átomos de flúor. As diferenças entre elas decorrem da substituição no átomo de hidrogénio, tendo a FLX um grupo amina secundária, enquanto que a NORFLX possui um grupo amina primária (Figura 5).

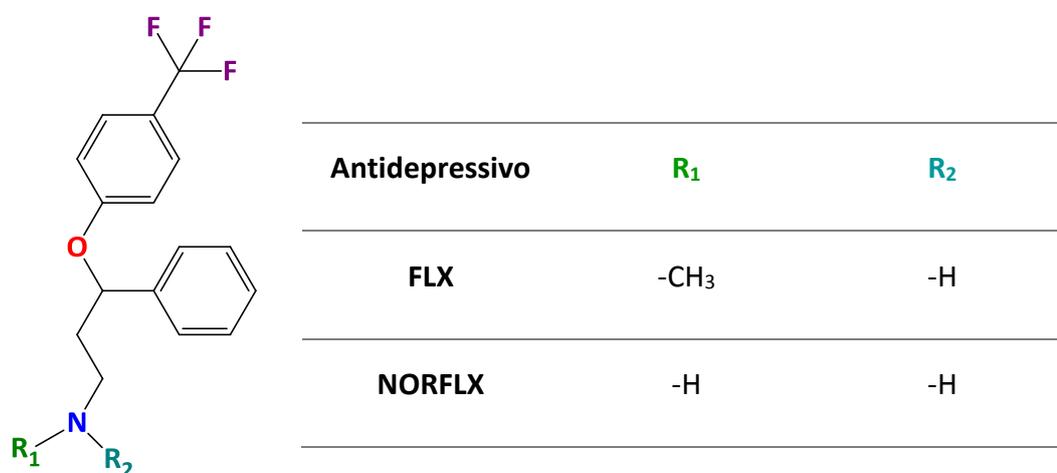


Figura 5. Estrutura química da FLX e NORFLX.

Segue-se uma tabela que resume as principais características físico-químicas da FLX e NORFLX.

Tabela 1. Algumas Propriedades Físico-Químicas da FLX e NORFLX [49].

Propriedades Físico-Químicas	FLX	S-NORFLX
CAS*	54910-89-3	126924-38-7
Nome IUPAC	N-metil-3-fenil-3-[4-(trifluorometil)fenoxi]propan-1-amina	3-fenil-3-[4-(trifluorometil)fenoxi]propan-1-amina
Massa Molecular (g/mol)	309,33	295,30
Fórmula molecular	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> F <sub>3</sub> NO	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> F <sub>3</sub> NO
Ponto de Fusão (°C)	179-182	-

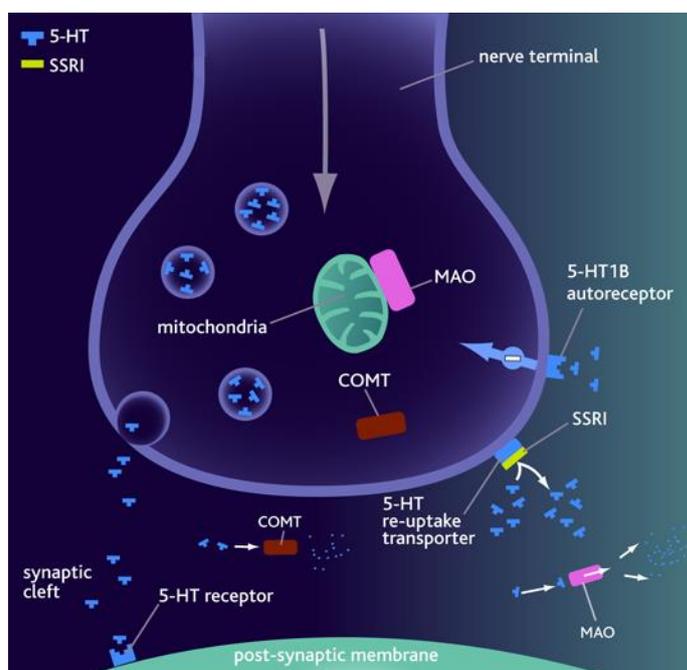
Ponto de Ebulição (°C)	-	-
Solubilidade em água (mg/ mL)	50 a 25 °C	-
Constante de Dissociação (pKa)	9,80	9,77
Coefficiente de partição (logP)	4,05	3,5

\* CAS – Chemical Abstracts Service

### 1.5.1.2. FARMACODINÂMICA E FARMACOCINÉTICA

A farmacodinâmica estuda a forma como o fármaco atua no organismo, particularmente ao nível do cérebro, no caso dos ADs. A atividade terapêutica dos ISRS, como já foi referido, faz-se sobretudo através da inibição da recaptação de 5-HT<sup>[50]</sup>.

A FLX, tal como os restantes ADs pertencentes à classe dos ISRS, é administrada ao paciente com o objetivo de restaurar os níveis de 5-HT na fenda sináptica. O seu mecanismo de ação passa pela ligação ao transportador de recaptação de 5-HT, evitando, assim, a reabsorção e subsequente degradação deste NT monoaminérgico. O bloqueio, por sua vez, conduz à acumulação de 5-HT nos terminais axónicos, regulando, assim, a concentração de 5-HT para dentro do intervalo normal<sup>[51]</sup> (**Figura 6**).



**Figura 6.** Mecanismo de ação dos SSRI (adaptado de<sup>[51]</sup>).

Para além de atuar na inibição da 5-HT, a FLX também inibe, embora com menor afinidade, a recaptação de NA e atua sobre os recetores 5-HT<sub>2C</sub>. É ainda controverso se a FLX atua ao nível destes recetores como agonista ou antagonista, porém, as evidências mais recentes apontam para o efeito antagonista [50, 52]. A NORFLX, por sua vez, também partilha a capacidade de bloquear o transportador de 5-HT, sendo ligeiramente mais potente que a FLX [48, 52].

Apesar de todos os ISRS compartilharem o principal mecanismo de ação, são estruturalmente distintos, fazendo com que apresentem perfis farmacocinéticos diversos [18].

A farmacocinética estuda a forma como o organismo atua sobre os fármacos, nomeadamente o nível da absorção destes, da sua distribuição sistémica, da sua metabolização e excreção [50]. Assim, a FLX é quase totalmente absorvida após a administração oral, apresentando uma biodisponibilidade superior a 72% [53]. No entanto, a sua disponibilidade sistémica é reduzida devido ao metabolismo de primeira passagem no fígado [54].

Em consequência do seu carácter lipofílico, a FLX apresenta um elevado volume de distribuição (20-45 L/kg), o que indica acumulação extensiva nos tecidos e elevada percentagem de ligação proteica (94,5% às proteínas do soro humano, incluindo albumina e  $\alpha$ -1-glicoproteína) [54, 55]. As concentrações plasmáticas máximas ocorrem dentro de 6-8 horas após uma única administração oral de uma dose de 40 mg [55].

Todos os ISRS apresentam alta ligação proteica. No entanto, a FLX é das únicas que apresenta um metabolito com atividade clínica significativa, a NORFLX [18], obtida através da sua extensiva metabolização no fígado, por isoenzimas do sistema citocromo P450 (CYP450). Este sistema tem por objetivo converter os fármacos em compostos que são libertados na circulação e assim, após passar pela parede intestinal e pelo fígado, o fármaco passa a existir sob a forma natural, mas também sob a forma biotransformada [56].

A NORFLX, o principal metabolito ativo, é formada por *N*-desmetilação da FLX através da isoenzima CYP2D6 [57]. Vários estudos indicam que o papel da CYP2D6 na biotransformação de ambos os enantiómeros da FLX pode ser clinicamente importante,

uma vez que existe, entre indivíduos, uma grande variabilidade genética na função desta enzima [57, 58]. Posteriormente, a FLX e a NORFLX sofrem reações de glucuronidação [45, 55] (Figura 7).

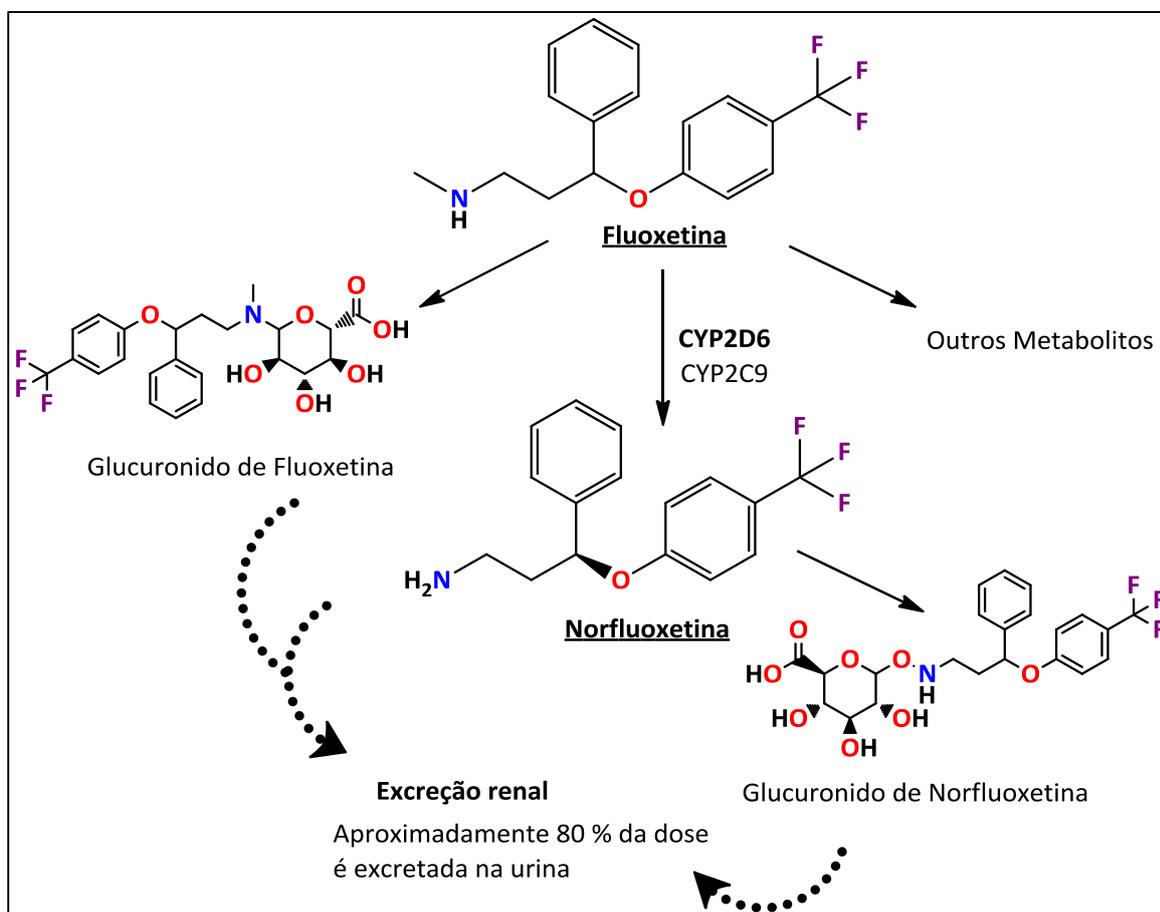


Figura 7. Representação esquemática do metabolismo da FLX.

A atividade da NORFLX como ISRS contribui para a longa duração da ação da FLX. Tanto a FLX como a NORFLX têm tempos de semi-vida ( $t_{1/2}$ ) que variam entre 1 a 6 dias e entre 5 e 6 dias, respectivamente [52].

A principal via de eliminação é, em grande parte, através do metabolismo oxidativo e conjugação no sistema hepático para metabólitos inativos que são depois excretados pelos rins [55, 59]. Cerca de 11% da dose é excretada na urina na forma inalterada ou como conjugado glucuronido e cerca de 7% como NORFLX [52, 59]. O enantiómero *S*- é eliminado mais lentamente e é o enantiómero predominante presente em *steady-state* [55].

Com uma dose diária constante, a concentração plasmática de *steady-state* é atingida após várias semanas de tratamento. Após a interrupção, tanto a FLX como a

NORFLX são eliminadas do organismo muito lentamente, o que implica alguns cuidados por parte do clínico, se decidir administrar um antidepressivo diferente ou até mesmo outro tipo de fármaco <sup>[59]</sup>. Além disso, a cinética da FLX é não linear, indicada pelo aumento desproporcional das concentrações no sangue associado a doses elevadas <sup>[60]</sup>.

### 1.5.1.3. EFEITOS ADVERSOS E INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS

Como qualquer outro fármaco, a FLX também apresenta efeitos secundários que podem variar de pessoa para pessoa. Alguns dos efeitos adversos mais comuns incluem boca seca, náuseas, anorexia, tonturas, ansiedade, sonolência, insônia, diarreia, disfunção sexual e dor de cabeça <sup>[55, 59]</sup>. Os efeitos secundários ocorrem geralmente nas primeiras duas semanas de tratamento e são menos graves e frequentes do que os observados com os TCA <sup>[55]</sup>.

Os casos de sobredosagem da FLX têm, habitualmente, um curso ligeiro. Os sintomas de incluem náuseas, vômitos, convulsões, disfunção cardiovascular variando de arritmias assintomáticas a paragem cardíaca, disfunção pulmonar e sinais de estado alterado do SNC, podendo ir desde excitação até mesmo ao coma. Segundo o INFARMED poucas foram as mortes atribuídas a sobredosagens com FLX, no entanto é recomendada a monitorização cardíaca e dos sinais vitais do paciente nestes casos <sup>[34]</sup>.

No controlo da sobredosagem, deve considerar-se a possibilidade do envolvimento de outros fármacos <sup>[34]</sup>. A seletividade do mecanismo de ação dos ISRS pode esclarecer a atenuação dos efeitos colaterais, quando comparado com os TCA, porém pode aumentar o risco de interação com outras substâncias que possam afetar a transmissão serotoninérgica, levando ao desencadeamento do síndrome serotoninérgico, condição que pode, potencialmente, colocar em risco a vida do doente <sup>[61]</sup>. Estes fármacos são, também, utilizados como substâncias de abuso e a gravidade do síndrome serotoninérgico e o risco de falhas cardíacas são muitas vezes subestimados <sup>[37]</sup>. Deste modo, deve ser evitado o uso concomitante de doses terapêuticas de outros ISRS, e de outras substâncias que também possam afetar os níveis de 5-HT, como TCA, IMAO e lítio <sup>[34]</sup>.

### 1.5.2. Clomipramina

A clomipramina (CLP) foi desenvolvida nos anos 60, como derivado clorado da imipramina [62]. Esta é popularmente conhecida pelo seu nome comercial Anafranil®, um TCA com um amplo espectro clínico, usado no transtorno depressivo major, casos de pânico e no transtorno obsessivo-compulsivo [45, 63]. Os TCA também são conhecidos como analgésicos eficazes para diferentes tipos de dor, especialmente a dor neuropática ou nevrálgica [55].

Apesar da introdução das novas drogas atípicas tais como as do grupo ISRS, a CLP ainda é o composto de referência para o tratamento destas desordens psiquiátricas [64].

#### 1.5.2.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Apesar da classificação baseada na estrutura ser cada vez menos utilizada, devido à introdução de novos ADs que não compartilharam estruturas comuns, a designação de TCA, continua a ser amplamente usada neste tipo de ADs.

Os TCA são estruturalmente semelhantes às fenotiazinas, possuindo três anéis benzênicos, com um substituinte alquilo amina no anel central [55].

Nos humanos, a CLP sofre uma desmetilação, formando a N-desmetilclomipramina (DESCLP), o seu metabolito ativo. As diferenças estruturais entre ambas as moléculas, decorre da substituição de um dos radicais metilo tendo a CLP um grupo amina terciária, enquanto que a DESCLP apresenta na sua constituição um grupo amina secundária (**Figura 8**).



**Figura 8.** Estrutura química da CLP e da DESC LP.

Segue-se uma tabela que resume as principais características físico-químicas da CLP e DESCLP.

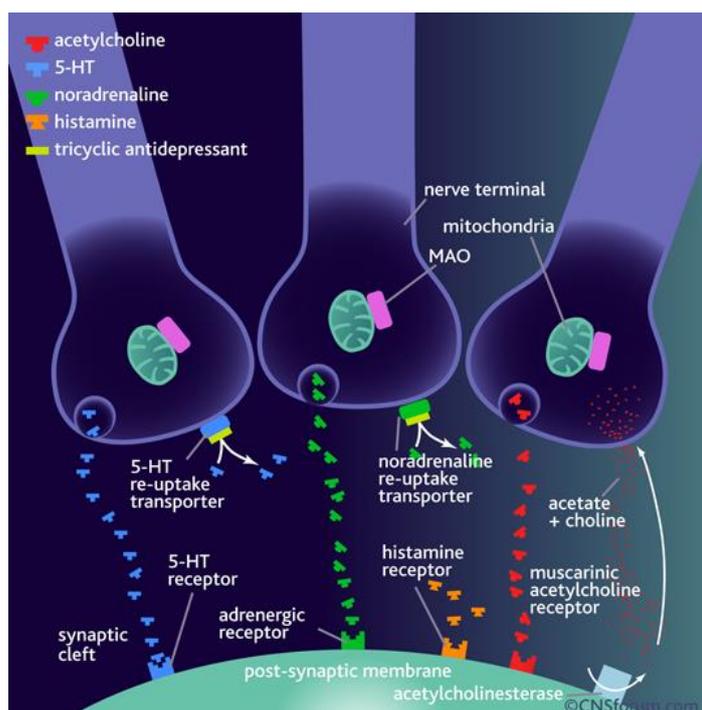
**Tabela 2.** Algumas propriedades físico-químicas da CLP e DESCLP [49, 55].

Propriedades Físico-Químicas	CLP	DESCLP
<b>CAS*</b>	303-49-1	303-48-0
<b>Nome IUPAC</b>	3- (3-cloro-10,11-di-hidro-5H - dibenzo [b, f] azepin-5-il) - N, N - dimetilpropan-1-amina	3-cloro-10,11-dihidro-N-metil-5H-dibenzo [b,f] azepin-5-propanamina
<b>Massa Molecular (g/mol)</b>	314,85	300,83
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub>
<b>Ponto de Fusão (°C)</b>	191,5 - 192	-
<b>Ponto de Ebulição (°C)</b>	-	439,5
<b>Solubilidade em água (mg/ L)</b>	0,294	0,00933
<b>Constante de Dissociação (pKa)</b>	9,2	10,02
<b>Coefficiente de partição (logP)</b>	5,19	4,5

### 1.5.2.2. FARMACODINÂMICA E FARMACOCINÉTICA

O mecanismo de ação comum a todos os TCA, é o bloqueio da recaptção das monoaminas, NA e 5-HT. A CLP, sendo uma amina terciária, inibe, preferencialmente, a recaptção de 5-HT, enquanto que os TCA que possuem uma amina secundária na sua constituição, como a DESCLP, têm maior afinidade para com a NA [55].

A ligação aos recetores de 5-HT e NA impede a recaptção dessas monoaminas na fenda sináptica e a sua subsequente degradação. Este bloqueio, por sua vez, conduz à acumulação de 5-HT e de NA nas sinapses e a concentração dos NT retorna para níveis normais [65] (**Figura 9**). A CLP também tem um amplo espectro de ação farmacológica, incluindo a anticolinérgica, propriedades anti-histamínicas e anti-serotoninérgicas [55].



**Figura 9.** Mecanismo de ação dos TCA (adaptado de [65]).

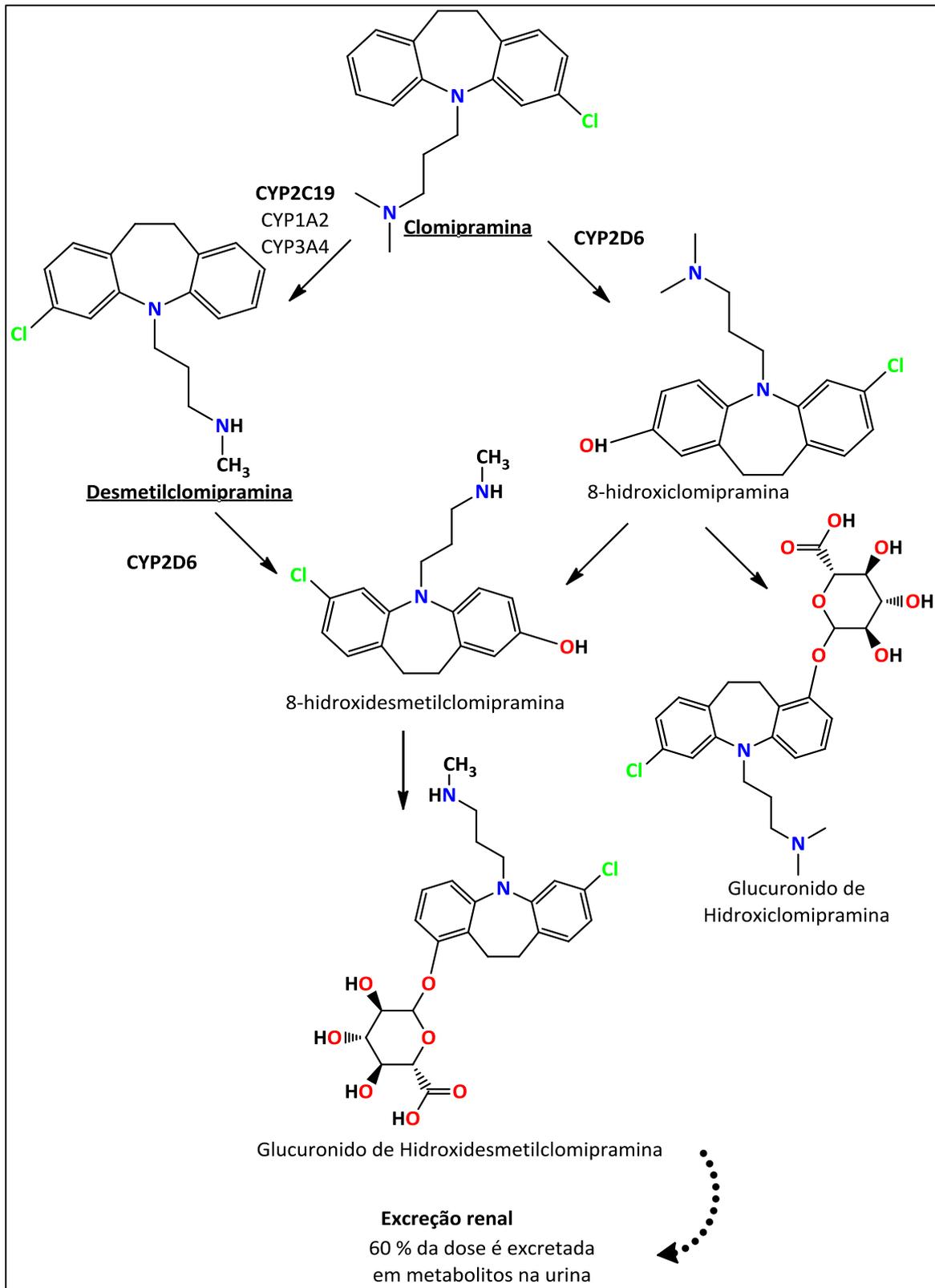
Relativamente à absorção, a CLP é bem absorvida a partir do trato gastrointestinal após administração oral. Devido ao grande metabolismo de primeira passagem, a biodisponibilidade é de aproximadamente 50% por via oral, não sendo afetada pelos alimentos [55].

As concentrações plasmáticas atingem o pico máximo 2-6 horas, após a administração de uma dose única de 50 mg e tal como outros TCA, as concentrações plasmáticas da CLP mostram grandes variações inter-individuais, em parte devido a diferenças genéticas no metabolismo da CLP. Em média, as concentrações plasmáticas em *steady-state* são alcançadas 1-2 semanas após a administração oral de doses múltiplas [55]. No entanto, estas concentrações podem ser afetadas pelo tabaco, o qual provoca uma diminuição das mesmas, o que não acontece com a DESCLP [55].

Devido à elevada lipossolubilidade, a CLP apresenta um grande volume de distribuição no fluido cefalorraquidiano, ao nível cerebral e no leite materno (9-25 L/kg), ligando-se fortemente às proteínas plasmáticas (97-98%), principalmente à albumina [55].

Tal como acontece com outros TCA, a CLP sofre biotransformação considerável antes da excreção, sendo a sua principal via de metabolismo de primeira passagem hepática a desmetilação por várias enzimas do sistema citocromo P450, dando origem ao metabolito ativo, a DESCLP [45, 66]. A DESCLP é um forte inibidor da recaptação da NA; no

entanto, em comparação com o fármaco original, esta é um fraco inibidor da recaptação de 5-HT <sup>[67, 68]</sup>. Posteriormente, tanto o fármaco precursor como o metabolito ativo, sofrem uma hidroxilação catalisada pela isoenzima CYP2D6, formando novos metabolitos farmacologicamente menos ativos, apesar de se apresentarem em concentrações bastante eminentes <sup>[69, 70]</sup>. Estes compostos hidroxilados são, depois, inativados por glucuronidação, sendo em seguida excretados na urina (**Figura 10**) <sup>[55]</sup>.



**Figura 10.** Representação esquemática do metabolismo da CLP (adaptado de <sup>[45]</sup>).

O  $t_{1/2}$  de eliminação é de cerca de 24 horas para a CLP e de 96 horas para a DESCLP, podendo variar, substancialmente, com diferentes doses, devido ao metabolismo, sendo

principalmente excretada na urina (51-60%) e nas fezes por eliminação biliar (24-32%) [55, 67].

### 1.5.2.3. EFEITOS ADVERSOS E INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS

Apesar da sua atividade benéfica, os TCA causam vários efeitos adversos. Infelizmente, esta classe de ADs também bloqueia os recetores histamínicos, colinérgicos e  $\alpha_1$ -adrenérgicos [71], variando os sintomas interindividualmente, devido a fatores como a quantidade de fármaco absorvido, idade do paciente e tempo decorrido desde a ingestão do fármaco. A maioria desses efeitos está relacionada com a sua atividade anticolinérgica, podendo ser letal em casos de doses excessivas [72, 73]. Alguns dos efeitos adversos da CLP incluem: tonturas, visão turva, taquicardia, boca seca, obstipação, insónia, hipotensão e hipertensão arterial e disfunção sexual [37, 55].

Os casos de overdose com os TCA são graves e potencialmente fatais, sendo que as manifestações críticas de *overdose* incluem arritmias cardíacas, acidose metabólica, hipotensão severa, convulsões e depressão do SNC, incluindo coma, podendo desencadear depressão respiratória e, conseqüentemente, levar à morte do indivíduo [55, 73].

Estes medicamentos são frequentemente prescritos em inúmeras combinações, levando a mais possíveis interações medicamentosas, enquanto que a dose é amplamente baseada em tentativa e erro [74]. A CLP pode interagir com uma variedade de fármacos, incluindo os IMAO, agentes antiarrítmicos, ISRS, agentes serotoninérgicos e outros TCA, os quais deve ser evitada a administração em simultâneo [55].

### 1.6. MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DE FÁRMACOS

A monitorização terapêutica medicamentosa (TDM) é um ramo da química e da farmacologia clínica especializada na medição das concentrações das drogas terapêuticas no organismo [75]. A TDM, é portanto, descrita como a prática clínica que visa medir as concentrações dos medicamentos e que usa princípios farmacocinéticos e farmacodinâmicos em amostras biológicas (normalmente soro ou plasma), numa tentativa de otimizar o tratamento terapêutico do doente, limitar os efeitos tóxicos do fármaco e na individualização da posologia [76-79].

Geralmente, os fármacos monitorizados são os que apresentam intervalos terapêuticos bem estabelecidos, ou seja, a maioria dos pacientes que apresenta concentrações plasmáticas dentro deste intervalo fixo, tem as suas desordens biológicas mantidas sob controlo e os efeitos adversos aceitáveis. Contudo, a aplicação clínica da TDM tem sido igualmente indicada em situações onde a eficácia do medicamento é questionada, nomeadamente nos casos em que o paciente exibe toxicidade, provavelmente relacionada com o fármaco, quando há suspeita de não adesão do paciente ao regime de dosagem estabelecido, nas situações de interações de fármacos, nas patologias associadas, em situações de mudanças na formulação, ou ainda quando a condição do paciente é refratária ao regime de dosagem convencional [80, 81].

A monitorização é realizada no laboratório, onde o parâmetro a avaliar e a interpretação adequada, irão influenciar diretamente os procedimentos de prescrição, no entanto e apesar das vantagens associadas, o seu uso na prática clínica está longe de ser considerado ótimo [82].

Entre as diversas categorias de fármacos, o uso da TDM tem sido estabelecido de forma particularmente bem-sucedida para os ADs. Esta permite uma supervisão ideal do regime farmacológico do paciente evitando, assim, complicações médicas, intoxicação e ausência de resposta ou de descumprimento [83].

Existem estudos sobre a relação entre a concentração plasmática e os efeitos clínicos que permitem estabelecer a gama terapêutica recomendada [84, 85]. No entanto, como já foi referido, as concentrações plasmáticas ótimas podem diferir amplamente dos intervalos estabelecidos, dependendo das características clínicas de cada doente [82].

No âmbito da monitorização dos fármacos em estudo do presente trabalho, é essencial estabelecer as respetivas doses terapêuticas, tóxicas e letais (**Tabela 3**). Relativamente aos TCA, a TDM tem sido estabelecida de forma bem sucedida, devido ao facto desta classe de ADs responder aos requisitos necessários para a sua monitorização, requisitos esses que incluem um índice terapêutico estreito e a determinação prévia da relação entre a concentração plasmática e a resposta terapêutica [86].

Contrariamente aos TCA, os ISRS não carecem de monitorização terapêutica regular, pois são mais seguros e eficazes e apresentam um intervalo terapêutico mais amplo e uma relação concentração plasmática – resposta antidepressiva não linear. Porém, a determinação da FLX em fluidos biológicos é necessária na TDM do fármaco, no

desenvolvimento da nova formulação, assim como em análise forense e toxicológica e, muitas vezes, pode ajudar a determinar se o paciente está a responder ao fármaco em questão [87].

Na **Tabela 3** encontram-se representados os valores de dose terapêutica, tóxica e letal para os ADs em estudo.

**Tabela 3.** Doses terapêuticas, dose tóxica e dose letal de FLX e NORFLX em sangue [37, 88, 89].

Antidepressivo	Dose Terapêutica <sup>a</sup> (µg/mL)	Dose Tóxica (µg/mL) <sup>b</sup>	Dose Letal (µg/mL) <sup>c</sup>
FLX	0,12 – 0,50	1,5 – 2,0	> 6
NORFLX	0,15 – 0,50	0,4	0,9 – 5,0
CLP	0,175 – 0,45	0,4 - 0,6	1 - 2
DESCLP	0,15 – 0,55	0,6 – 0,8	1 - 2

<sup>a</sup> concentração terapêutica durante o *steady-state*.

<sup>b</sup> concentrações no plasma/soro que produzem efeitos colaterais/ sintomas relevantes ao nível tóxico e clínico.

<sup>c</sup> concentrações no plasma/soro em casos fatais reportados.

Segundo Paracelso (1493-1541), “Todas as substâncias são venenos; não há nenhuma que não seja veneno. Somente a dose certa diferencia um veneno de um remédio” [37, 90]. Embora nos dias de hoje a definição de tóxico seja mais complexa, o conceito proposto por Paracelso permanece atual, onde não podemos esquecer que todas as substâncias se podem tornar tóxicas, abrangendo também as que habitualmente são assumidas como alimentos ou medicamentos [91].

### 1.7. IMPORTÂNCIA MÉDICO-LEGAL DO ESTUDO DE ANTIDEPRESSIVOS

A presença ou ausência de um fármaco antidepressivo, pode ser um elemento fundamental na determinação da causa de morte de um indivíduo, ou na explicação do comportamento de um indivíduo em situações a serem investigadas pelas entidades competentes.

O uso irracional de medicamentos tornou-se um problema relevante em todo o mundo, estimando-se que metade dos medicamentos disponíveis são inadequadamente

prescritos, dispensados ou vendidos, e que metade de todos os pacientes não toma adequadamente os seus medicamentos. A automedicação, os erros na dosagem, a confusão do medicamento e medicamentos ao alcance das crianças são alguns dos fatores que contribuem para o aumento das intoxicações medicamentosas acidentais. Por outro lado, fenómenos como o abuso, a subutilização ou o excesso de administração de fármacos conduzem a um desperdício de recursos, relativos ao tratamento de uma patologia e a um perigo generalizado para a saúde pública [89-91].

Posto isto, surge o contexto deste trabalho, na elucidação de uma técnica validada que permita fazer um controlo mais rigoroso dos níveis de determinados fármacos, nomeadamente de ADs, em fluidos biológicos. Deste modo, poderá ser exequível acompanhar o avanço tecnológico e aplicar a metodologia desenvolvida tanto em contexto clínico, como por exemplo no monitoramento biológico, como em contexto forense no caso das intoxicações.

# **CAPÍTULO II**

## **2. Determinação de Antidepressivos em Matrizes Biológicas**



## **CAPÍTULO II - DETERMINAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS EM MATRIZES BIOLÓGICAS**

### **2.1. MATRIZES BIOLÓGICAS**

A seleção da matriz biológica desempenha um papel fundamental na toxicologia forense e clínica. Atualmente existe uma grande variedade de amostras utilizadas na toxicologia, tais como tecidos, órgãos colhidos nas autópsias, fluidos biológicos (de cadáveres ou de vivos), cabelo, entre outras, para a detecção e quantificação de analitos [92]. Compete ao toxicologista selecionar, entre as amostras biológicas disponíveis, a mais adequada para análise, conforme a especificidade do caso e o tipo de análise pretendida, assim como tendo em conta os procedimentos de análise e os recursos disponíveis [93].

As matrizes biológicas normalmente utilizadas para análise de ADs com interesse clínico e forense são urina, sangue ou plasma, saliva, cabelo e, nos casos *post-mortem*, qualquer tecido ou fluido é considerado adequado para a análise específica solicitada [94].

O sangue é a matriz de eleição quando se pretende relacionar as concentrações do fármaco com os efeitos farmacológicos [95]. Apresenta-se como uma das poucas amostras que podem ser colhidas em indivíduos vivos e, geralmente, é a matriz escolhida para a detecção, identificação, quantificação e interpretação dos resultados toxicológicos [96]. Nos casos *post-mortem*, o sangue total é mais usado para a pesquisa de substâncias desconhecidas, ao passo que o sangue periférico femoral são mais utilizados na quantificação das substâncias confirmadas [97].

A preferência por esta matriz deriva do facto de ser um fluido biológico que é distribuído por todo o corpo, de tal modo que as substâncias presentes nesta matriz podem exercer a sua ação sobre uma vasta gama de órgãos. Apesar de ser fácil a sua obtenção, não deixa de ser invasivo, tornando-se desconfortável para os pacientes.

A urina é outra matriz que pode ser colhida tanto em indivíduos vivos como em cadáveres. Devido à filtração renal, a urina apresenta baixo teor proteico e lipídico, tornando-se uma matriz menos complexa que o plasma ou soro ou outras matrizes biológicas [98].

A análise desta matriz pode ser efetuada com o objetivo de obter informação acerca das concentrações de metabolitos, de vias metabólicas, erros no metabolismo, efeitos dos medicamentos e monitorização da dosagem terapêutica, exposição a químicos

de fontes exógenas, consumo de drogas, controlo de *doping*, etc [77]. Geralmente, a urina é a amostra de eleição na monitorização biológica e, principalmente, a segunda matriz preferida para análise toxicológica (rastreamento de drogas de abuso e/ou medicamentos), devido à facilidade de colheita, volume disponível e a presença de um elevado número de produtos provenientes das vias metabólicas endógenas ou exógenas [37, 99]. Além disso, as concentrações dos fármacos são relativamente altas e podem permanecer por muito mais tempo na urina do que no sangue, uma vez que a urina pode conter a substância alvo em conjunto com os metabolitos do diagnóstico e os compostos excretados podem ser concentrados pelos rins [77, 98].

O facto de ser constituída por cerca de 99 % de água e desprovida de lípidos e outras macromoléculas endógenas, facilita a preparação da amostra e reduz, significativamente, a presença de possíveis interferências, quando são utilizadas técnicas cromatográficas ou imunoensaios.

Outras matrizes alternativas, como o cabelo [100], a saliva [101] e alguns órgãos [102] têm, também, sido usadas em toxicologia na análise de fármacos, como os ADs.

## 2.2. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO

A análise cromatográfica de fármacos ou de outras substâncias em amostras biológicas como sangue, urina, saliva, etc., requer um pré-tratamento da amostra, devido à complexidade da própria matriz, uma vez que contêm, normalmente, proteínas, sais, ácidos, bases e vários compostos orgânicos que podem ser semelhantes ao analito de interesse. Além disso, nem sempre podem ser analisadas diretamente, devido à sua incompatibilidade com os sistemas cromatográficos e muitos dos compostos a analisar se encontram em concentrações vestigiais [103, 104].

Assim sendo, a preparação de amostra tem como objetivo a obtenção do composto de interesse numa determinada forma e concentração, que possa ser rapidamente introduzida e separada no sistema cromatográfico, a eliminação do maior número possível de compostos interferentes e, por último, fornecer um método robusto e reprodutível, que seja independente das variações na matriz da amostra [105, 106]. Representa, portanto, um passo crucial no processo analítico, que influencia a fiabilidade e precisão dos resultados, com deteção adequada e um tempo de análise razoável [104, 107].

Diversas técnicas de extração têm sido empregues para a remoção de compostos interferentes e pré-concentração dos analitos. Estas técnicas podem ser divididas em técnicas de preparação de amostra convencionais (mais utilizadas em análises de rotina), onde se inclui a extração líquido-líquido (LLE), a extração em fase sólida (SPE) e a precipitação de proteínas (PPT) e em técnicas de preparação de amostra modernizadas, minimizando o consumo de amostra e de solvente e aumentando a especificidade e seletividade da extração em comparação às técnicas tradicionais [106].

Portanto, a escolha da técnica de preparação da amostra deve ser cuidadosamente considerada, tendo em conta alguns requisitos analíticos, incluindo a complexidade da matriz, a separação cromatográfica, a polaridade dos analitos alvo e a necessidade de alto rendimento [107, 108].

Vários métodos têm sido publicados para a extração de ADs em diferentes matrizes biológicas, sendo as técnicas de preparação de amostra usualmente usadas a LLE [109, 110] e a SPE [111-113]. No entanto, a introdução de técnicas miniaturizadas como a microextração em fase sólida (SPME) [46, 114], a microextração por sorvente empacotado (MEPS) [101, 115, 116] e, mais recentemente, o QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*) [117], têm também sido aplicadas nos últimos tempos, sendo reportadas com sucesso na extração de diversos fármacos incluindo ADs, em matrizes biológicas como plasma, urina e saliva.

De seguida serão abordadas algumas das técnicas anteriormente referidas para uma melhor compreensão das mesmas.

### **2.2.1. Extração Líquido – Líquido (LLE)**

A LLE ou extração por solventes é uma técnica utilizada para separar, concentrar e purificar compostos orgânicos existentes numa fase líquida. Baseia-se na distribuição de uma substância entre duas fases imiscíveis colocadas em contato, onde numa das fases o analito se encontra dissolvido (fase aquosa, amostra biológica) e a outra é um solvente orgânico (solvente extrator) [118, 119]. Os compostos mais hidrofílicos têm maior afinidade pela fase aquosa polar, enquanto que os compostos mais hidrofóbicos serão encontrados, principalmente, no solvente orgânico [120].

### 2.2.1.1. Extração de antidepressivos por LLE

Devido ao caráter básico dos ADs, as amostras são inicialmente alcalinizadas com soluções de NaOH, NH<sub>4</sub>OH ou com soluções tampão, de forma a alcançar valores de pH superiores a 8,5. A gama de polaridade dos analitos incluídos no método analítico, bem como da matriz biológica, determina a escolha do solvente orgânico [108]. O uso de soluções tampão facilita a transferência dos analitos para a fase orgânica, uma vez que o elevado teor de sais diminui a solubilidade destes fármacos na matriz biológica.

Malfará *et al.* (2007)<sup>[109]</sup> determinaram, simultaneamente, 10 ADs em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica, tendo aplicado, com sucesso, na análise de amostras reais. A extração foi efetuada com uma mistura de hexano/ álcool isoamílico (99:1, v/v) apresentando percentagens de recuperação razoáveis, exceto para um dos ADs analisados. Castaing *et al.* (2007)<sup>[121]</sup> aplicaram uma abordagem semelhante para a quantificação de 8 ADs e 5 metabolitos ativos em amostras de sangue. Apesar da metodologia descrita ter permitido uma identificação e quantificação específica, alguns dos ADs analisados não obtiveram boas percentagens de recuperação.

Embora a LLE seja uma técnica relativamente simples e oferecer reprodutibilidade, é um procedimento demorado e laborioso, especialmente quando esta é aplicada na extração e pré-concentração dos analitos nas análises toxicológicas. A tendência para formação de emulsões entre as fases, a possibilidade de contaminação e a perda dos analitos durante o processo são algumas das desvantagens da LLE. Além disso, requer grandes quantidades de amostra e de solventes tóxicos de custos elevados e apresenta pobre potencial de automatização [104, 122, 123].

Apesar da eficácia da LLE na extração de fármacos como os ADs em matrizes biológicas, vários métodos alternativos têm sido desenvolvidos, incluindo-se, entre eles, a SPE, a SPME, a MEPS e o QuEChERS.

### 2.2.2. Extração em Fase Sólida (SPE)

A SPE é uma técnica que tem sido estabelecida, nos últimos anos, como um método muito eficaz para o pré-tratamento da amostra e *clean-up* em matrizes biológicas em análises clínicas e toxicológicas de fármacos [124]. É um processo no qual as substâncias a extrair (analitos) que se encontram numa amostra (matriz) são extraídas após passarem

por uma fase sólida (sorvente), que geralmente está contida num reservatório em forma de seringa ou cilindro (cartucho) [119].

A base do processo extrativo assemelha-se à LLE, visto que também envolve a partição dos analitos entre duas fases. Porém, em vez de duas fases líquidas imiscíveis como na LLE, na SPE a partição dos analitos ocorre entre uma fase líquida (matriz) e uma fase sólida (sorvente) [125].

Quando os analitos estão presentes na matriz em concentrações elevadas, estes podem ser eluídos enquanto os interferentes da matriz ficam retidos nesta, utilizando-se um solvente seletivo para a remoção dos interferentes e um outro solvente para eluir os analitos [119].

Comparando com a LLE, a SPE apresenta várias vantagens, tais como alta seletividade, extratos limpos, ausência de emulsões, menor utilização de solventes e maior rendimento por automatização. Além disso, possui uma grande variedade de sorventes que permitem o desenvolvimento e melhoramento dos procedimentos de extração [124, 126, 127].

Diversos tipos de sorventes são utilizados como fase sólida na SPE permitindo, assim, a aplicação desta técnica a amostras de natureza diversa. A polaridade ou a carga iónica do analito de interesse determinam a escolha do sorvente e do solvente mais adequados [119]. Deste modo, a SPE pode ser dividida em 4 categorias, de acordo com o mecanismo de extração: fase reversa, fase normal, troca iónica e a exclusão molecular [128].

Vários procedimentos SPE têm sido descritos usando sorventes com mecanismo de fase reversa. Os analitos são separados com base na sua polaridade, envolvendo geralmente, uma matriz polar (aquosa) e uma fase sólida apolar ou hidrofóbica, usualmente composta por sílica funcionalizada com grupos octil (C<sub>8</sub>) ou octadecil (C<sub>18</sub>). A retenção dos analitos na fase sólida deve-se a forças atrativas entre ligações carbono-hidrogénio do analito e grupos funcionais apolares da superfície do sorvente (interações *van der Waals* ou forças de dispersão) [108, 119]. Os solventes de eluição são, regra geral, apolares podendo também ser utilizados solventes como o metanol ou acetonitrilo que são polares [128].

A SPE em fase normal envolve o uso de analito polar e matriz pouco polar e uma fase sólida polar. A retenção do analito em condições de fase normal é, primariamente,

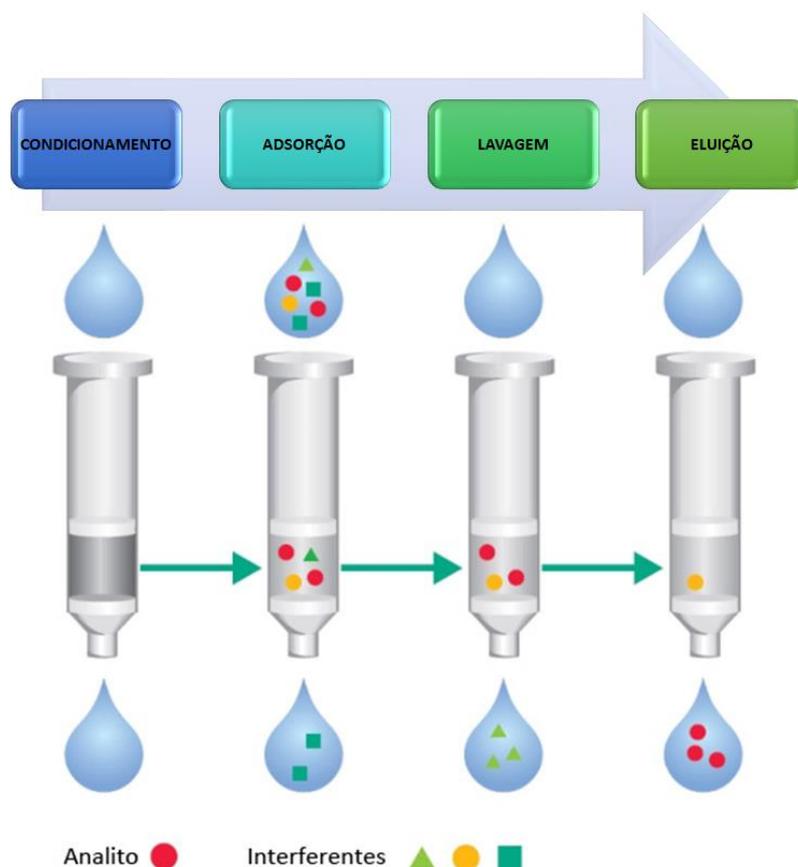
devido a interações entre os grupos polares do analito e os grupos polares da superfície do sorvente, destacando-se as interações por ligações de hidrogénio e as interações dipolo-dipolo. A eluição é efetuada usando solventes polares que permitem a quebra destas ligações <sup>[119]</sup>.

Na SPE de troca iónica, o sorvente é composto por grupos funcionais de troca aniónica ou catiónica, responsáveis pelas interações eletrostáticas que ocorrem entre o grupo funcional carregado do analito e os grupos funcionais carregados ligados ao sorvente. Para que uma substância seja retida em condições de troca iónica, o analito, assim como os grupos funcionais ligados ao sorvente, devem estar ionizados através do ajuste do pH da amostra. Na eluição é utilizada uma solução de pH que neutraliza tanto os grupos funcionais do analito como os da superfície do sorvente. As forças eletrostáticas responsáveis pela interação analito-sorvente são quebradas e a substância é eluída.

Por fim, a SPE por exclusão molecular, apesar de ser a menos usada em toxicologia, a separação ocorre em função das dimensões do analito, do tamanho dos poros da fase sólida e na capacidade das suas moléculas penetrarem nos poros <sup>[118]</sup>. Em geral, esta técnica é usada em conjunto com fases estacionárias de fase reversa e de troca iónica <sup>[128]</sup>.

Existem métodos com a combinação de fases estacionárias de fase reversa e de troca iónica. Este tipo de SPE denomina-se por modo misto. Uma das maiores aplicações da SPE de modo misto é o isolamento de drogas e metabolitos a partir de amostras de urina e sangue <sup>[128]</sup>. Devido às propriedades básicas dos ADs, os sorventes de modo misto permitem uma extração mais seletiva por remoção de material endógeno. Para permitir a retenção destes compostos por mecanismo de troca catiónica, a amostra deve ser inicialmente condicionada com soluções ácidas e os analitos, posteriormente, eluídos com solventes orgânicos alcalinizados <sup>[108]</sup>. A utilização de um solvente orgânico adequado permite a eluição dos compostos retidos por adsorção, enquanto os que foram retidos por troca iónica são eluídos por troca com um contra-íon presente no solvente, ou por conversão à sua forma molecular com o auxílio de eluentes iónicos, ácidos ou básicos <sup>[128, 129]</sup>.

Um método de SPE compreende, em geral, as seguintes etapas: condicionamento da fase estacionária, aplicação da amostra (adsorção do analito ao sorvente), lavagem da fase estacionária (eliminação dos interferentes) e por fim a eluição (recuperação do analito) conforme se mostra na **Figura 11**.



**Figura 11.** Representação esquemática do procedimento SPE.

Numa primeira etapa, a fase sólida é condicionada com um solvente adequado, geralmente metanol, cuja finalidade é solvatar os grupos funcionais da fase estacionária, assegurando assim a interação da matriz com o sorvente <sup>[118]</sup>. A escolha do solvente dependerá principalmente do material do sorvente a ser ativado <sup>[130]</sup>. Esta etapa é fundamental na SPE em fase reversa, e sem este tratamento a amostra polar passa por pequenos canais gerados no sorvente sem efetuar o contacto necessário para ocorrer a extração <sup>[131]</sup>. O uso do metanol, como solvente intermediário, permite uma melhor superfície de contato entre as fases e, conseqüentemente, uma melhor eficiência de extração. O condicionamento pode servir também para eluir alguma impureza presente no cartucho <sup>[130]</sup>.

Seguidamente, a amostra é transferida para o cartucho de SPE. A amostra deve ser eluída lentamente, usando vácuo ou pressão positiva. Neste processo, as impurezas são eluídas enquanto que o analito fica retido devido a interações químicas com a fase estacionária. Esta estratégia é usada especialmente quando o analito está presente em baixas concentrações, ou quando a matriz contém múltiplos componentes de diferentes

polaridades <sup>[119]</sup>. Também se pode reter os interferentes da matriz enquanto os analitos são eluídos, sendo esta estratégia usada quando o analito se encontra em altas concentrações e como forma de limpar a amostra antes de ser efetuada a análise <sup>[119, 132]</sup>.

A etapa de limpeza, *clean up*, é fundamental para eliminar compostos provenientes da matriz, que podem interferir no método analítico. Podem ser utilizados solventes com força de eluição intermediária para a eluição de impurezas antes do analito de interesse ser eluído. Estes solventes são denominados de "solventes de lavagem" (*wash solvent*) e não devem ter força suficiente para remover o analito do sorvente <sup>[130]</sup>. Normalmente usa-se água e soluções tampão, para além de solventes orgânicos diluídos na solução de lavagem, para a eliminação dos interferentes mais hidrofóbicos <sup>[118]</sup>.

Por fim, aplica-se um solvente que remova o analito retido na fase estacionária. A escolha do solvente de eluição é um parâmetro importante e está diretamente relacionada com a polaridade do analito e o sorvente usado na SPE <sup>[130]</sup>, devendo este ser capaz de quebrar as interações entre o analito e a fase estacionária e recuperá-lo no menor volume possível. Além disso, o solvente deverá ser compatível com os métodos analíticos a utilizar.

### 2.2.2.1. Extração de antidepressivos por SPE

Esta técnica tem sido utilizada, com sucesso, em diversas áreas, como farmacêutica <sup>[133]</sup>, alimentar <sup>[134]</sup>, toxicológica <sup>[135]</sup>, ambiental <sup>[136]</sup>, etc. Diversos trabalhos têm sido publicados usando a SPE na determinação de ADs em matrizes biológicas. Wille *et al.* (2005)<sup>[126]</sup> desenvolveram um procedimento SPE para a monitorização terapêutica de 13 ADs de nova geração e respetivos metabolitos ativos em amostras de plasma. Um total de 10 sorventes foram avaliados, e os melhores resultados foram obtidos com o de troca catiónica. Para além disto, 5 solventes de eluição foram testados, tendo sido escolhida a mistura de metanol com 5% de amónia. A metodologia por SPE mostrou ser reprodutível, com boas percentagens de recuperação, exceto para um dos ADs analisados. Nevado *et al.* (2006)<sup>[113]</sup> descreveram um processo de SPE otimizado e validado para a análise do citalopram, da FLX e respetivos metabolitos em amostras de urina. A extração foi realizada usando uma fase estacionária C<sub>18</sub> e metanol como solvente de eluição. O

método proposto provou ter elevada sensibilidade, seletividade e especificidade, sendo aplicado com sucesso na análise quantitativa e qualitativa de amostras de pacientes.

Apesar da SPE apresentar vantagens em relação a outros métodos mais clássicos, como maior facilidade de execução e sensibilidade, esta técnica tem algumas limitações. Uma delas diz respeito à etapa de desadsorção do analito aprisionado no sorvente de SPE que requer, geralmente, o uso de solventes tóxicos, além de ser relativamente dispendiosa e lenta <sup>[119]</sup>. Quando se trata de matrizes mais complexas como o sangue, pode ocorrer a obstrução do cartucho e, por vezes, o solvente de eluição é incompatível com o sistema de análise tendo de ser evaporado e o resíduo, depois, dissolvido num solvente adequado <sup>[137, 138]</sup>.

Face às limitações da LLE e da SPE, surgem novas tendências na preparação de amostra, como a automação, a miniaturização, o elevado rendimento e o acoplamento *online* com instrumentos analíticos permitindo, assim, uma redução do volume de amostra, de solvente e tempo de análise <sup>[137]</sup>.

Neste contexto, técnicas miniaturizadas como a MEPS surgiram com grande potencial na preparação da amostra.

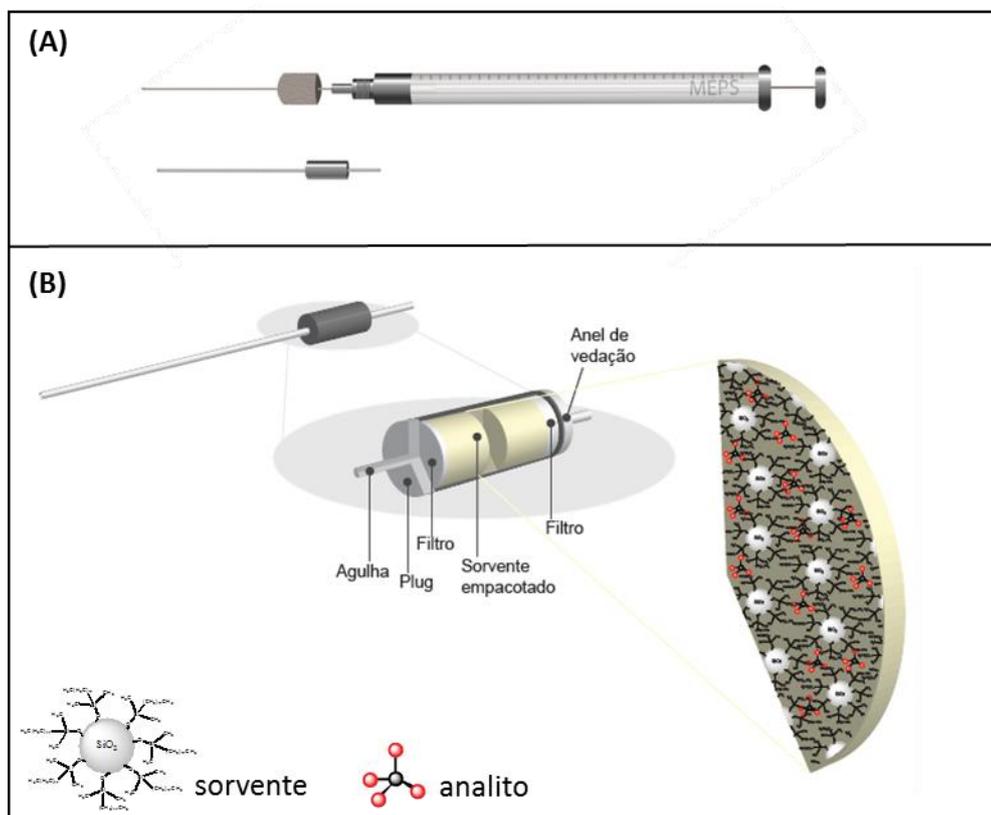
### 2.2.3. Microextração por sorvente empacotado (MEPS)

A MEPS é uma técnica recente de preparação de amostra desenvolvida por Abdel-Rehim *et al.* <sup>[139]</sup> (AstraZeneca, Suíça), em 2004. Esta técnica é uma miniaturização da técnica convencional da SPE, na qual os volumes das amostras e dos solventes (eluentes) foram reduzidos de mililitros para microlitros, tornando-a atrativa do ponto de vista analítico, económico e ambiental <sup>[107]</sup>.

A sua elevada seletividade e simplicidade, combinada com a utilização de volumes reduzidos, têm tornando esta técnica uma opção atraente e uma poderosa ferramenta na preparação de amostra na realização de desafios analíticos e bioanalíticos <sup>[140]</sup>. Além disso, combina a extração, a concentração e *clean-up* da amostra num único dispositivo (**Figura 12-A.**), podendo ser conectada *online* com instrumentos analíticos, como a cromatografia gasosa (GC) ou a cromatografia líquida (LC), sem qualquer alteração <sup>[107, 140]</sup>.

Na MEPS, o cartucho convencional da SPE é substituído por uma espécie de coluna miniaturizada ( $\approx 1 \text{ cm} \times 0,2 \text{ mm}$  diâmetro interno) com, aproximadamente, 1-2 mg de

material sólido empacotado, conectada a uma agulha de uma microseringa, conforme ilustrado na **Figura 12-B**.<sup>[141]</sup> Os analitos presentes na amostra são retidos após passarem pela fase estacionária (sorvente), acondicionada numa microcoluna também designada de BIN (*Barrel Insert and Needle Assembly*) ou cartucho MEPS.



**Figura 12.** A - Microseringa MEPS e sorvente C<sub>18</sub>. B - Visão geral de um sorvente da MEPS (adaptado de <sup>[107]</sup>).

Os cartuchos de SPE, são geralmente utilizados uma única vez e descartados; já os sorventes da MEPS, dependendo da complexidade da amostra e dos cuidados do analista, podem ser reutilizadas de 50 a 100 vezes. A vantagem da miniaturização do sistema de extração na MEPS permite, numa única etapa, que os analitos retidos na microcoluna sejam eluídos (dessorvidos) da fase extratora com alguns microlitros de solvente orgânico ou de fase móvel, podendo ser injetados diretamente no sistema analítico <sup>[141]</sup>.

A seleção do sorvente é um fator importante para a obtenção de altas taxas de recuperação <sup>[141]</sup>. As fases estacionárias comercialmente disponíveis para a MEPS são as mesmas que são utilizadas na SPE. Inclui-se a sílica (fase normal), a sílica funcionalizada com os grupos etil (C<sub>2</sub>), C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub> como fases reversas, as resinas de troca aniônica e catiónica (R-AX e R-CX, respetivamente), o carbono grafitizado poroso (PGC), as fases

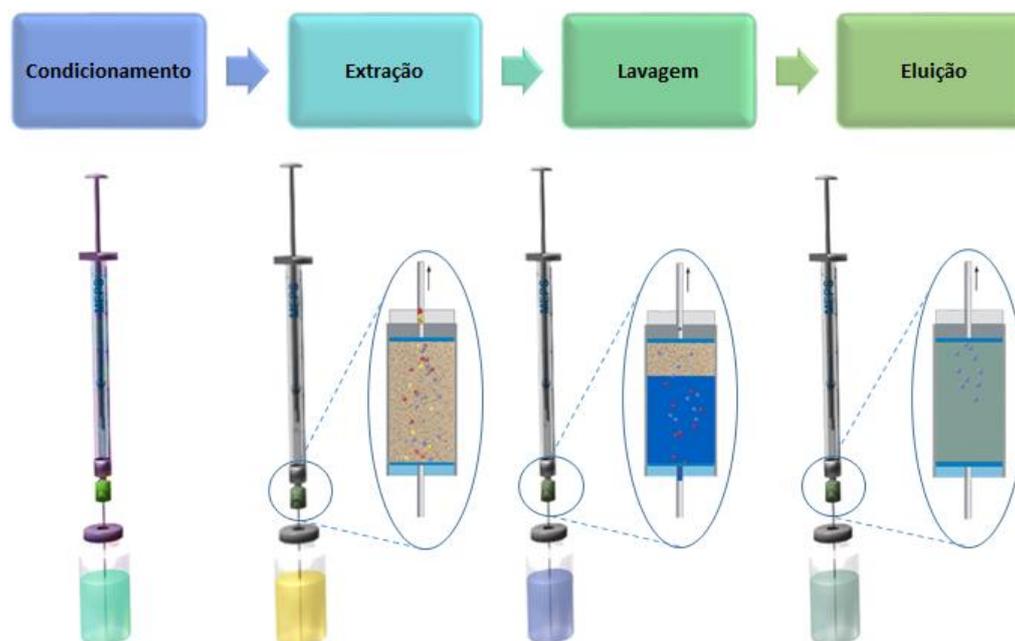
poliméricas de estireno divinil-benzeno (HLB-DVB, H-DVB) e a fase mista  $M_1$  ( $C_8 + SCX$ ). No entanto, a diversidade de fases extratoras para MEPS disponíveis no comércio é muito inferior à variabilidade de fases para SPE. Os materiais sorventes para MEPS apresentam, geralmente, partículas irregulares de, aproximadamente, 50  $\mu\text{m}$  e porosidade 60 Å<sup>[141]</sup>. A **Tabela 4** apresenta algumas das propriedades dos sorventes mais populares disponíveis comercialmente para a MEPS.

**Tabela 4.** Propriedades dos sorventes MEPS.

	Tipo de Sorvente	Nome do Sorvente	Tipo de fase	Propriedades
SÍLICA	Não-modificada	Sílica	Normal	Altamente polar.
	Modificada	C <sub>2</sub>	Reversa	Relativamente apolar (grupo funcional de cadeia curta).
		C <sub>8</sub>		Menos retentivo que o C <sub>18</sub> para compostos apolares.
		C <sub>18</sub>		Altamente hidrofóbico e extremamente retentivo para compostos apolares. Retém a maioria dos analitos orgânicos de matrizes aquosas.
	Funcionalizada	SCX	Modo misto (fase reversa, troca iónica)	Adequado para compostos fracamente básicos.
		SAX		Adequado para compostos fracamente ácidos.
M <sub>1</sub>		Mecanismos de retenção dupla, retém uma gama de compostos neutros, básicos e ácidos. Tem maior seletividade para compostos básicos de fluidos biológicos.		
POLIMÉRICA DE POLESTIRENO DVB	Não-modificada	SDVB	Reversa	Retenção elevada de compostos apolares.
	Modificada	HDVB	Reversa	Permite uma interação fase reversa de 100%
	Funcionalizada	PEP	Modo misto (fase reversa, troca iónica)	PS-DVB polimérico modificado com grupos funcionais de ureia, para uma retenção equilibrada de analitos polares e apolares.
		R-CX		Material de PS-DVB polimérico parcialmente funcionalizado com grupos de ácido sulfónico para uma retenção de analitos básicos e apolares equilibrada.
		R-AX		Material de PS-DVB polimérico parcialmente funcionalizado com grupos de amina quaternária para se obter a retenção equilibrada de analitos acídicos e apolares.

**Abreviaturas:** C<sub>2</sub> – sílica-etil; C<sub>8</sub> – sílica-octil; C<sub>18</sub> – sílica octadecil; HDVB – *highly cross-linked* de poliestireno divinilbenzeno; M<sub>1</sub> – fase mista; PEP – polímero polar reforçado e altamente poroso; PS-DVB – poliestireno de divinilbenzeno; R-AX – poliestireno-divinilbenzeno parcialmente funcionalizado com grupos de ácido sulfónico; R-CX – poliestireno-divinilbenzeno parcialmente funcionalizado com grupos de amina quaternários; SAX – troca aniónica forte; SCX – troca catiónica forte; S-DVB – estireno de divinilbenzeno.

A extração por MEPS utiliza as mesmas etapas da SPE, nomeadamente, condicionamento do sorvente, amostragem (passagem da amostra pelo sorvente), lavagem e eluição, como apresentado na **Figura 13**.



**Figura 13.** Representação esquemática das diferentes etapas no processo MEPS.

A diferença encontra-se, principalmente, no modo de execução da técnica, uma vez que a amostra é aspirada pela seringa em vários ciclos através da fase extratora, ou seja, é aspirada e dispensada através da agulha uma ou mais vezes. O aumento do número de ciclos resulta num aumento das taxas de recuperação dos analitos <sup>[141]</sup>, contudo, pode levar à saturação da fase estacionária não sendo possível adsorver mais compostos.

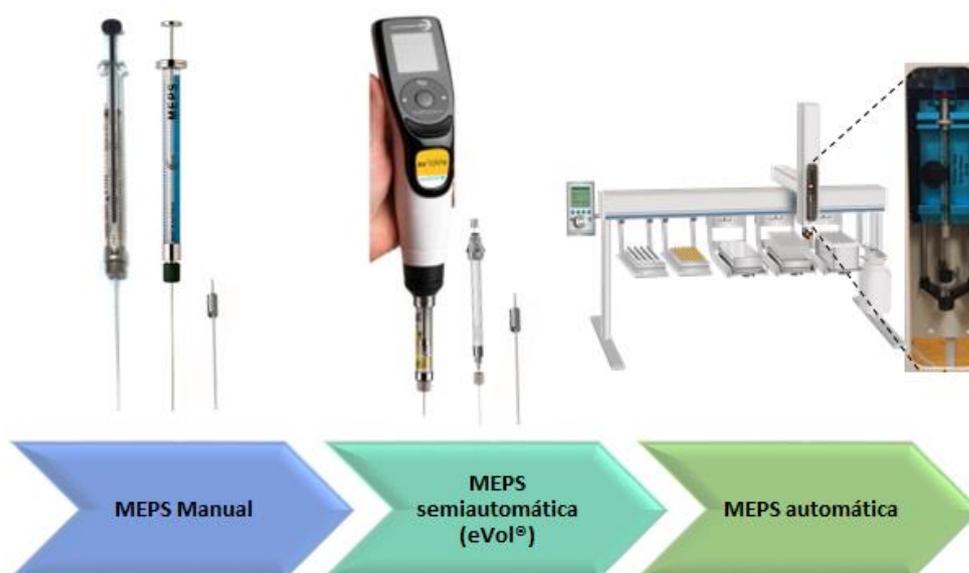
Após a passagem da amostra pela microcoluna, os analitos ficam, idealmente, retidos na fase estacionária, sendo depois eluídos diretamente no injetor do LC ou GC <sup>[142]</sup>. Entre a etapa da aplicação da amostra e a eluição, é feita a lavagem do sistema com solvente, como por exemplo, água, solução aquosa com 0,1% de ácido fórmico, soluções tampão ou misturas de solução aquosa com solvente orgânico (metanol ou isopropanol), para a remoção dos compostos endógenos. Nesta etapa de limpeza, a concentração de solvente orgânico, assim como o pH das soluções tampão deverão ser tidos em conta para evitar ou minimizar a perda dos analitos. Em geral, o aumento da percentagem de solvente orgânico na solução aumenta a perda do soluto <sup>[141, 142]</sup>.

Os analitos retidos no sorvente são eluídos com um solvente orgânico, como o metanol, o isopropanol ou o acetonitrilo, ou ainda com a fase móvel do sistema analítico de LC [142, 143]. O ajuste do pH da solução de eluição (ionização dos solutos) é um fator importante para a obtenção de taxas de extração elevadas. O aumento do volume do solvente de eluição e da percentagem de solvente orgânico favorece a dessorção dos analitos [141].

Para reutilizar os cartuchos da MEPS, os sorventes são, geralmente, lavados com água e com o solvente utilizado na eluição, permitindo este passo minimizar o efeito de memória (*carry-over*) [142].

As variáveis da MEPS como volume de amostra, pH da amostra, número de ciclos, tipo de solventes de lavagem, assim como volume e tipo de solvente de eluição, são otimizadas não só para aumentar a sensibilidade analítica, mas também para minimizar o volume da amostra, o consumo de solventes orgânicos, o *carry-over* e o tempo de análise [141].

Durante a última década, o formato da MEPS foi sendo melhorado, de modo a facilitar o trabalho do analista, tornando a técnica mais rápida e menos dependente do operador. Atualmente, a MEPS encontra-se disponível comercialmente na forma manual, semi-automatizada e totalmente automatizada (**Figura 14.**) [140].



**Figura 14.** Evolução do formato MEPS (adaptado de [140]).

O formato mais simples e mais reportado é a MEPS manual, onde o cartucho (BIN) contendo a fase sólida é manualmente operado através de uma seringa analítica. Este foi o primeiro formato desenvolvido e comercialmente disponível, sendo o mais utilizado pela comunidade científica [107].

A versão semiautomática (eVol®) foi recentemente introduzida pela SGE Analytical Science e pela Thermo Fisher Scientific, tornando-se um grande avanço no desenvolvimento de métodos analíticos, uma vez que é mais fiável que a MEPS manual. A eVol® é um dispositivo eletrónico, digital e programável que permite a planificação de tarefas, como a aspiração e dispensa de líquidos, assim como todos os procedimentos na preparação de amostras. Possui, ainda, seringas analíticas de vidro (XCHANGE®) que podem ser facilmente substituídas, de modo a prevenir a contaminação cruzada entre solventes. Esta combinação digital com a parte analítica e o facto de poder ser calibrada pelo utilizador permite maior precisão e maior automação de possibilidades para o processo de extração da MEPS. Além disso, fornece volumes de fluxo e de velocidade personalizáveis e precisos facilitando a repetição da extração dos analitos alvo [107].

Por fim, a MEPS totalmente automatizada pode ser facilmente obtida usando as mesmas seringas analíticas XCHANGE® em amostradores automáticos (*autosamplers*). Estas plataformas robóticas permitem a automatização da preparação de amostra com elevada precisão. A sua utilização *online* com os sistemas analíticos (LC ou GC), facilita e minimiza a intervenção do utilizador, necessitando apenas de colocar as amostras para serem processadas e seleccionar o método a ser utilizado [107, 140].

Esta recente inovação tecnológica é uma mais-valia para análises de rotina, aumentando desta forma a produtividade laboratorial.

Em suma, os formatos semiautomáticos e totalmente automáticos possibilitam métodos analíticos mais fiáveis e precisos do que a MEPS manual, uma vez que os erros associados ao operador humano são minimizados.

### **2.2.3.1. Extração de antidepressivos por MEPS**

A MEPS tem sido empregue na análise de drogas, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e outros poluentes orgânicos em amostras de água ambientais. Além disso, também tem sido aplicada com sucesso na determinação qualitativa e

quantitativa de uma grande variedade de medicamentos e seus metabolitos em amostras biológicas, tais como plasma, soro, sangue, urina, saliva e cabelo <sup>[140]</sup>. Tal como a SPE, a versatilidade da MEPS tem despertado interesse em diversas áreas, como clínica <sup>[144]</sup>, farmacêutica <sup>[145]</sup>, forense <sup>[146, 147]</sup>, toxicologia <sup>[116]</sup>, alimentar <sup>[148]</sup> e até na pesquisa ambiental <sup>[149, 150]</sup>.

Vários trabalhos têm sido reportados usando a MEPS como um método de preparação de amostra na extração de ADs em fluidos biológicos, por causa da sua velocidade, sensibilidade e seletividade.

Na extração de analitos em matrizes complexas como o sangue ou o plasma, é necessária uma diluição das amostras, geralmente, com água ou com uma solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico, para reduzir a viscosidade das mesmas, evitando, assim, a formação de coágulos e conseqüente bloqueio do cartucho da MEPS <sup>[140, 143]</sup>. No trabalho de Chaves *et al.* (2010)<sup>[151]</sup> encontra-se descrita uma metodologia analítica usando a MEPS para a determinação de 5 ADs, incluindo a FLX, em amostras de plasma. A extração por MEPS foi realizada usando uma fase mista, a M<sub>1</sub> (C<sub>8</sub> + SCX) como sorvente e uma mistura de tampão fosfato 0,05 mol/L com metanol (55:45, v/v) como solvente de eluição. A técnica demonstrou ser rápida, exata e seletiva, usando um reduzido volume de amostra (400 µL) e utilizando o sorvente em mais de 50 vezes. As amostras foram diluídas usando uma solução tampão fosfato (pH 4,0) de concentração 0,05 mol/L, de modo a aumentar a sensibilidade da MEPS. Segundo Maria Queiroz <sup>[141]</sup> o uso de soluções tampão para a diluição dos fluidos biológicos, apesar de favorecer o processo da MEPS, pode danificar a fase sólida à base de sílica devido aos valores de pH em intervalos extremos (< 3 ou >7) os quais devem ser evitados.

Mais recentemente, Saracino *et al.* (2014)<sup>[78]</sup> desenvolveram um procedimento MEPS para a extração da agomelatina, um antidepressivo melatonérgico, em amostras de saliva e de plasma. Ambas as matrizes foram diluídas em 100 µL de água e fatores como o número de ciclos de extração, a velocidade do fluxo e o tipo de solventes de eluição que afetam a performance da MEPS, foram otimizados. As melhores condições de extração foram obtidas usando um sorvente C<sub>8</sub> com 8 ciclos de passagem de amostra a uma velocidade de 5 µL/s e eluindo o analito com metanol. Os autores concluíram que o método desenvolvido é rápido, sensível, seletivo e exato, sendo adequado para análise de rotina deste fármaco.

Outras amostras biológicas também têm sido usadas, com sucesso, na determinação de ADs por MEPS. Rani *et al.* (2011)<sup>[152]</sup> realizaram a quantificação de TCA, incluindo a CLP, e ADs não tricíclicos em amostras de plasma e de urina, usando um sorvente C<sub>18</sub>. As amostras não foram diluídas antes do procedimento MEPS e os analitos foram eluídos com metanol. A técnica revelou ser versátil para diferentes matrizes, mantendo a sua simplicidade, rapidez, seletividade e sensibilidade.

Embora a MEPS apresente várias vantagens, tal como outros métodos de preparação de amostra, também possui algumas limitações. De facto, os sorventes podem ser facilmente obstruídos devido à utilização de amostras viscosas ou altamente concentradas sendo necessária uma diluição prévia das amostras ou a desproteção das mesmas com metanol ou acetonitrilo. Outra das limitações é a gama de sorventes disponíveis. Contudo, esta limitação está a ser gradualmente melhorada, à medida que a MEPS vai se tornando mais popular, com a introdução de fases poliméricas, assim como a possibilidade de comercialização de sorventes personalizados para aplicações de interesse, sorventes MIPs (*Molecular Imprinting Polymers*)<sup>[107, 140]</sup>.

Em suma, apesar de algumas limitações, a MEPS é uma das técnicas de extração de amostra mais simples e apresenta mais vantagens quando comparado com outras técnicas de preparação de amostra. Não só mantém as principais características de sucesso da SPE, nomeadamente a sua vasta aplicação e simplicidade, como também melhora o desempenho analítico que pode ser obtido com várias gamas de analitos e matrizes, além de ser mais rápida, económica e favorável ao ambiente<sup>[140]</sup>.

Resumidamente, um dos objetivos deste trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia extrativa, utilizando a MEPS semiautomática para a determinação simultânea de duas classes de ADs diferentes e seus metabolitos ativos em amostras de urina.

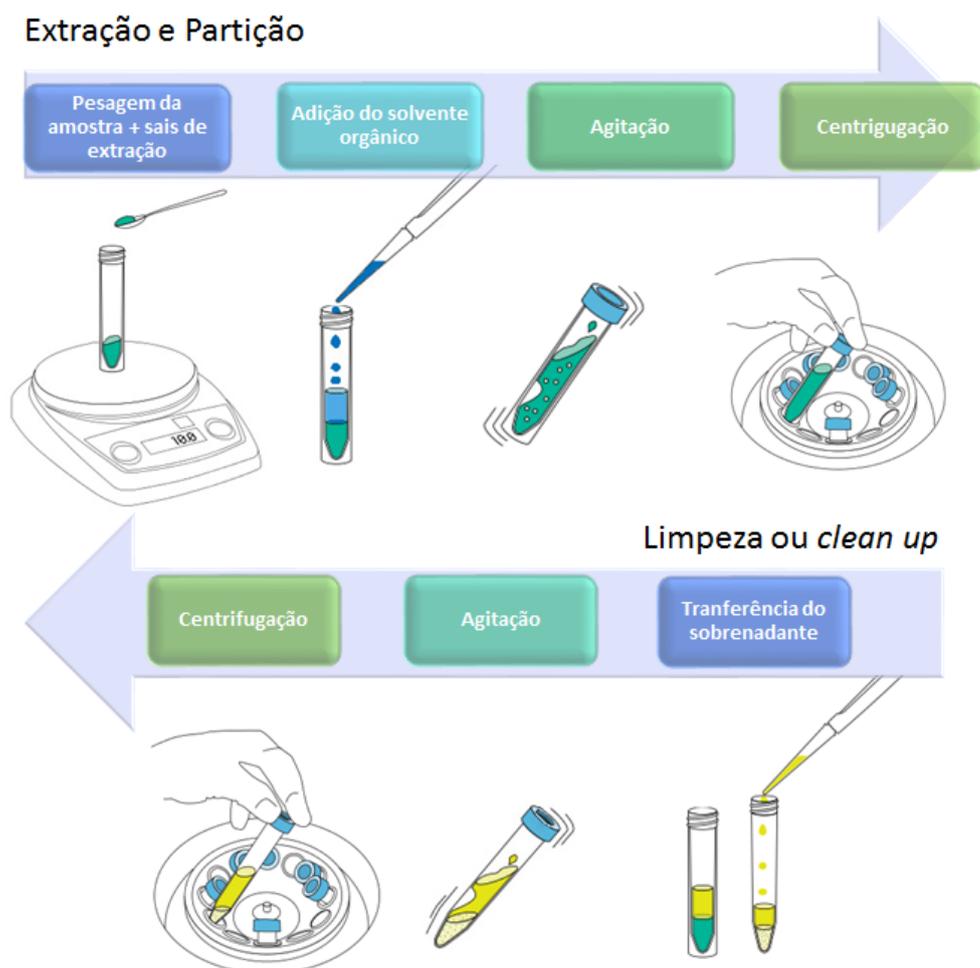
#### **2.2.4. QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*)**

Uma outra técnica para o pré-tratamento de amostras recentemente desenvolvida designa-se por QuEChERS. Esta técnica foi apresentada em 2003 por Anastassiades *et al.* (2003)<sup>[153]</sup>, sendo desenvolvida com o objetivo de se obter um método que permitisse a análise simultânea de diversos resíduos de pesticidas presentes em amostras de frutas e vegetais e que fosse simultaneamente fácil e rápida de efetuar, com baixos custos, uma

vez que outras técnicas de pré-tratamento de amostras, nomeadamente a SPME, não substituíram com sucesso a abordagem multi-resíduos tradicional <sup>[154]</sup>.

O nome QuEChERS advém da junção das suas principais características, sendo uma técnica rápida, fácil, económica, efetiva, robusta e segura. Esta apresenta menor tempo de preparação de amostra quando comparada com técnicas tradicionais, fornecendo menos etapas processuais e reduzindo a quantidade de amostra e de solventes <sup>[155]</sup>.

Ao contrário de muitas outras técnicas de preparação de amostra, que são adaptadas para a extração seletiva de analitos alvo, no caso do QuEChERS a abordagem é mais direcionada para a remoção da matriz <sup>[156]</sup>. Basicamente, este método compreende 2 fases: extração/ partição da amostra e uma etapa de *clean up* da amostra por SPE dispersiva (**Figura 15**).



**Figura 15.** Representação esquemática das diferentes etapas no processo QuEChERS (adaptado de <sup>[157]</sup>).

Na primeira etapa é realizada uma LLE, com a adição de um solvente orgânico à amostra, geralmente acetonitrilo. O uso de acetonitrilo possibilita a extração de menor quantidade de interferentes lipofílicos provenientes da amostra, como por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos, proporciona a extração de uma ampla faixa de analitos com diferentes polaridades e apresenta boa compatibilidade do extrato final com a LC e com a GC [158].

Posteriormente, são adicionados sais para extrair os analitos de interesse e induzir a separação das fases [156]. No método original proposto por Anastassiades *et al.* (2003)<sup>[153]</sup>, utilizavam o cloreto de sódio e o sulfato de magnésio como sais de extração, posteriormente em 2005 a técnica foi modificada com a introdução de sais tampão para melhorar as recuperações do analito [159]. A adição destes sais na etapa de partição promove o efeito de *salting out*, propiciando melhores percentagens de recuperação para analitos polares, uma vez que a adição de sais diminui a solubilidade destes compostos na fase aquosa, assim como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa [155].

O sal secante MgSO<sub>4</sub> possui uma grande capacidade de remoção de água quando comparado com outros sais. Além disso, quando hidratado sofre uma reação exotérmica, tendo como resultado um aquecimento entre 40 a 45°C da amostra durante as etapas de extração/partição, favorecendo deste modo a extração, especialmente dos compostos apolares [160].

A combinação de sais com um solvente orgânico é muito favorável, uma vez que a extração é mais rápida, fácil, apresenta baixo custo e tem a grande vantagem de não diluir o extrato da amostra, proporcionando a separação das fases orgânica e aquosa [155]. De modo a facilitar a interação dos sais e do solvente com os analitos presentes na matriz, a amostra é homogeneizada, por agitação manual e/ou com o auxílio do vórtex. Seguidamente, a amostra é centrifugada, para que ocorra uma separação bem distinta entre as fases. A camada orgânica superior é recolhida e transferida para um tubo de centrífuga contendo materiais sorventes, procedendo-se a etapa do *clean up* da amostra.

Esta etapa é também denominada por extração em fase sólida dispersiva (dSPE). Ao contrário dos métodos existentes para limpeza com SPE, que utilizam cartuchos ou colunas, a dSPE permite que o *clean up* e a redução de água residual sejam efetuados de forma rápida e simultânea. Esta etapa de remoção de água proporciona um extrato final de menor polaridade, facilitando, assim, a precipitação de interferentes polares [155]. Além

disso, a componente dispersiva permite a distribuição dos sais para que se difundam ao longo de toda a amostra para uma extração mais completa <sup>[161]</sup>.

Os sorventes para a dSPE são selecionados com base na sua capacidade de reter compostos da matriz. O sorvente PSA (do inglês *primary secondary amine*) é eficaz na remoção de ácidos orgânicos, de açúcares e de outros compostos polares presentes na matriz <sup>[156]</sup>. A sua estrutura bidentada tem um elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amina primária e secundária <sup>[155]</sup>. Outros sorventes também são comumente usados na dSPE, como por exemplo o C<sub>18</sub>, o GCB (do inglês *graphitised carbon black*) e o MgSO<sub>4</sub>. Estes sorventes devem ser usados com algum critério, uma vez que também podem reter os analitos de interesse. O PSA apresenta maior afinidade para com compostos acídicos, enquanto que o GCB retém preferencialmente compostos com geometria planar. A complexidade e diversidade entre matrizes requer diversas opções de limpeza da amostra e, por este motivo, os sais de dSPE existem disponíveis numa variedade de mistura de sorventes comercializados em *kits* <sup>[156]</sup>.

Uma limpeza eficiente promove a robustez e a confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico e garante uma maior vida útil do *liner* e das colunas cromatográficas, reduzindo assim a contaminação do sistema cromatográfico e minimizando o efeito de matriz <sup>[162-164]</sup>.

Após a adição da camada orgânica superior ao tubo de *clean up* com os sorventes de dSPE, é realizada, novamente, a homogeneização por agitação manual e/ou com o auxílio do vórtex, seguida por centrifugação. O sobrenadante pode ser adicionado a um vial, para respetiva análise cromatográfica, ou pode ser evaporado e posteriormente injetado no sistema analítico <sup>[156]</sup>.

#### 2.2.4.1. Extração de antidepressivos por QuEChERS

Nos últimos anos, a popularidade do QuEChERS tem crescido, com algumas modificações no seu procedimento, para a adaptação de novos desafios analíticos <sup>[156]</sup>.

Apesar da versão original ter fornecido excelentes resultados, Lehotay e Anastassiades foram alterando a técnica, de modo a melhorar as percentagens de recuperação. Em 2007 e 2008, surgem então os métodos oficializados “QuEChERS-acetato” e “QuEChERS-citrato”, respetivamente <sup>[155]</sup>.

A capacidade de ser modificado e o seu sucesso na análise de multi-resíduos, tem permitido a sua aplicação a uma variedade de analitos e matrizes. Posto isto, a utilidade do QuEChERS tem expandido fora da análise tradicional de pesticidas em frutas e legumes. Essas outras aplicações incluem a extração de antibióticos <sup>[165]</sup>, produtos farmacêuticos <sup>[166]</sup> e de medicamentos veterinários <sup>[167, 168]</sup>, em amostras biológicas ou produtos alimentares.

Recentemente, o método QuEChERS tem também despertado a atenção da comunidade química forense <sup>[161]</sup>, mas poucos trabalhos foram publicados nesta área usando esta técnica para a análise de fármacos e de outros compostos em amostras biológicas. No trabalho de Anzillotti *et al.* (2014)<sup>[169]</sup> encontra-se desenvolvido um método de extração QuEChERS simplificado para a determinação simultânea de drogas de abuso e de benzodiazepinas, em amostras de sangue. O método validado apresentou boa repetibilidade, precisão e linearidade, mostrando boa eficiência de extração e sendo aplicado, com sucesso, a diversas amostras de sangue de casos forenses. A extração das amostras de sangue foi efetuada num único passo, utilizando uma dSPE dispersiva com um solvente orgânico (acetato de etilo) na presença de uma mistura de PSA / MgSO<sub>4</sub>.

Poucos trabalhos foram encontrados na literatura para a extração de ADs em amostras biológicas por QuEChERS. Usui *et al.* (2012)<sup>[170]</sup> aplicaram com sucesso um QuEChERS modificado como técnica de extração, a mais de 90 compostos com importância na área forense, entre eles diversas classes de fármacos, inclusive ADs, e alguns tóxicos em amostras de sangue. A extração foi realizada utilizando 0,5 mL de amostra de sangue, diluído com água destilada, e usando acetonitrilo como solvente. No passo da dSPE, uma mistura de sorventes, nomeadamente PSA, C<sub>18</sub> e MgSO<sub>4</sub>, foi usada para purificação da amostra. Para a maioria dos compostos estudados foram obtidas boas recuperações e o efeito matriz dos analitos variou entre 80% e 116%, indicando que a maioria dos analitos são ligeiramente influenciados pela matriz do extrato de sangue. O método foi aplicado a um caso fatal, onde foi confirmada a sua capacidade de extrair facilmente vários tipos de compostos e metabolitos em amostras de sangue.

Como referido anteriormente, dada a versatilidade da técnica, assim como a sua simplicidade, rapidez, baixo custo, entre outras características, esta apresenta um grande potencial entre as técnicas de preparação de amostra. Além disso, algumas das limitações do QuEChERS, como a quantidade de amostra e de solvente requerida, pode ser

ultrapassada devido à capacidade de modificação do método. As etapas facilmente personalizáveis fornecem um caminho essencial para aplicações futuras podendo satisfazer algumas das necessidades dos laboratórios de análise <sup>[156]</sup>.

Após uma pesquisa bibliográfica, até à data da realização deste trabalho não foi encontrada nenhuma aplicação do QuEChERS na extração de ADs, em amostras de urina. Assim, um dos objetivos deste trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia otimizada e validada para a extração da FLX, CLP e seus metabolitos ativos em amostras urina por QuEChERS modificado. Os resultados obtidos encontram-se descritos no **Capítulo V**.

### **2.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA**

A cromatografia, de um modo geral, apresenta-se como um método de separação de componentes de uma mistura em que a separação depende da distribuição das diferentes moléculas entre duas fases: uma fase estacionária e uma fase móvel. A classificação dos métodos cromatográficos depende da natureza da fase estacionária e da fase móvel, assim como dos seus estados físicos e mecanismos de separação <sup>[171]</sup>.

A cromatografia líquida é constituída por uma fase móvel líquida que atravessa ao longo da fase estacionária, numa direção definida. Os analitos vão sendo retidos na fase estacionária de acordo com a sua afinidade para com a mesma e os compostos com menor afinidade são retidos mais fracamente, percorrendo mais rapidamente ao longo do enchimento, enquanto que os que estabelecem interações mais fortes com a fase estacionária e saem mais lentamente até à separação completa dos componentes duma mistura <sup>[172]</sup>. Este processo de arrastamento dos analitos de uma amostra pela fase móvel ao longo da fase estacionária até à saída destes, designa-se por eluição <sup>[173]</sup>.

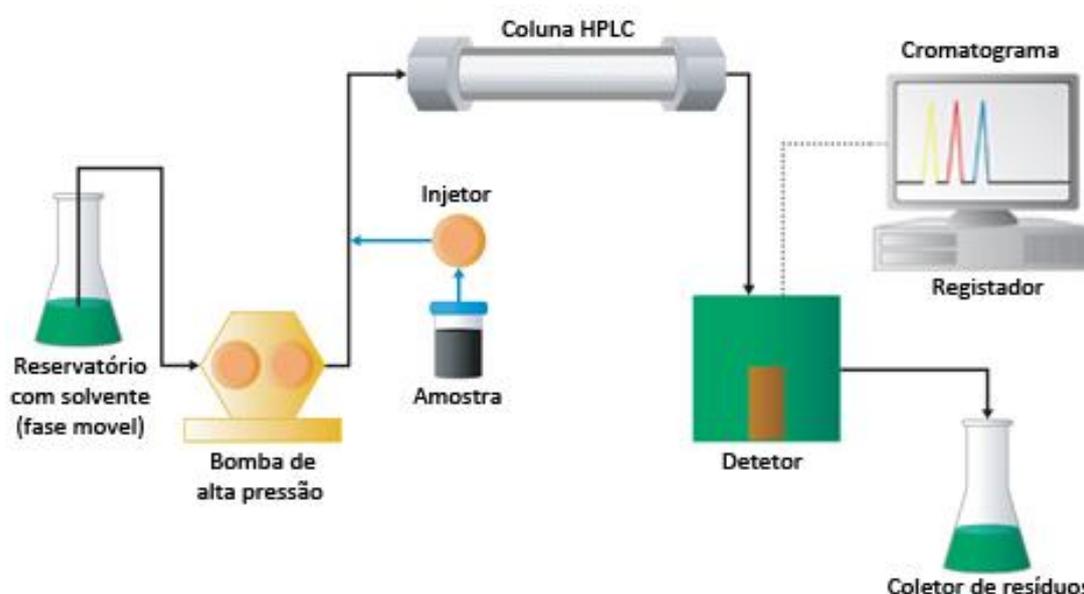
#### **2.3.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

No início dos anos 60, surge uma extensão da cromatografia líquida clássica, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) <sup>[174]</sup>. Esta utiliza equipamentos sofisticados que podem ser totalmente automatizados, o que a torna indispensável em vários laboratórios. Este tipo de cromatografia apresenta uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases

imiscíveis, uma fase móvel líquida e uma fase estacionária contida numa coluna. As amostras são dissolvidas num solvente adequado e analisadas em solução. Essa solução é depois introduzida no sistema e arrastada pela fase móvel, sob pressão alta, sendo forçada a atravessar a fase estacionária [119].

Quando comparada com a cromatografia em coluna clássica, a técnica de HPLC é caracterizada por utilizar colunas de pequenas dimensões (3 a 25 cm de comprimento e 2 a 5 mm diâmetro), normalmente em aço, contendo a fase estacionária. As fases estacionárias podem ser de natureza diversa e são habitualmente constituídas por partículas de dimensões muito reduzidas (1,5 a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro), originando pressões elevadas no sistema, quando atravessadas pela fase móvel. O fluxo e a composição da fase móvel podem ser fácil e rigorosamente modificados durante a análise cromatográfica [119].

Um sistema de HPLC consiste, essencialmente, numa bomba, num sistema de injeção, numa coluna de separação e num detetor, todos conectados numa instalação resistente a altas pressões, que podem ir até 300 atm [172]. Possui, ainda, um ou mais reservatórios com os solventes que são utilizados, para compor a fase móvel e um sistema computadorizado dotado de programas específicos, que permitem converter os sinais do detetor em informação útil, nomeadamente a visualização do cromatograma e o tratamento dos dados obtidos [119]. Na **Figura 16** encontra-se a representação esquemática de um equipamento básico para HPLC.



**Figura 16.** Esquema representativo de um equipamento básico para HPLC (adaptado de [119]).

A amostra é introduzida no sistema por um de sistema de injeção. Este sistema compreende, habitualmente, um injetor com um sistema de válvulas, ao qual se pode adaptar um reservatório calibrado e de capacidade conhecida, onde é colocada a amostra a analisar. Este processo pode ser automatizado através da utilização de injetores automáticos <sup>[119]</sup>.

A separação cromatográfica ocorre numa coluna contendo a fase estacionária, fase esta que pode estar ainda dentro de um compartimento que pode ser aquecido, permitindo utilizar o aquecimento na otimização da separação cromatográfica. Seguidamente, uma bomba (ou sistema de bombas), associada a um controlador, transporta os líquidos contidos nos reservatórios nas proporções selecionadas (eluente ou fase móvel), e com o fluxo requerido ao longo de todo o sistema cromatográfico. Estas têm como função garantir que o fluxo da fase móvel permaneça constante e reprodutível. A eluição pode ser feita de modo isocrático, quando é utilizada uma fase móvel composta por um único solvente, ou por uma mistura de solventes com a mesma composição. No caso da eluição em gradiente, ocorre uma variação da composição da fase móvel ao longo da separação cromatográfica, de modo a obter a melhor resolução por unidade de tempo. O sistema pode ser binário, ternário ou quaternário dependendo do número de reservatórios que possui <sup>[119]</sup>.

Finalmente, o resultado obtido é registado por um detetor na forma de gráfico (cromatograma), que representa a área do analito, em função do tempo. Os detetores medem, habitualmente, um parâmetro físico-químico característico dos analitos em estudo e devem ser capazes de reconhecer os analitos à saída da coluna cromatográfica <sup>[119]</sup>.

### **2.3.1.1. Mecanismos de separação e fases estacionárias**

Dependendo da natureza da fase estacionária, podem ser considerados quatro tipos principais de processos cromatográficos em HPLC: adsorção, troca iónica, exclusão e partilha (ou partição).

Na cromatografia de adsorção a fase estacionária é um adsorvente (por exemplo, gel de sílica) e a separação é baseada em processos de adsorção/ dessorção repetidos <sup>[119]</sup>. Ocorre uma competição entre moléculas do soluto e do solvente pelos sítios ativos do

adsorvente, estando relacionada com a interação entre os grupos funcionais das partículas do suporte da fase estacionária e os grupos polares das moléculas do soluto [175].

A cromatografia de troca iônica baseia-se na interação eletrostática entre o soluto e a fase estacionária [175]. Este tipo de cromatografia é usada exclusivamente em amostras iônicas ou ionizáveis. A fase estacionária possui à superfície cargas de natureza oposta à dos íons da amostra (catiões ou aniões) e a separação ocorre pela diferente força de atração dos analitos para com esta. A fase estacionária utilizada neste método é, geralmente, uma resina de poliestireno entrecruzada com divinilbenzeno à qual são ligados os grupos iônicos [119, 175]. Normalmente os compostos que são separados por este método são ácidos carboxílicos, bases orgânicas, peptídeos e aminoácidos, que podem ionizar-se em soluções com pH devidamente tamponado, bem como aniões inorgânicos e catiões metálicos ou complexos [176].

Na cromatografia de exclusão, a fase estacionária é constituída por um material poroso de dimensão precisa e a separação ocorre de acordo com o tamanho molecular dos analitos: as moléculas de maiores dimensões não cabem nos poros e são eluídas em primeiro lugar e as moléculas mais pequenas penetram nos poros e são eluídas mais tarde [119]. Utiliza-se este método na separação de materiais orgânicos e inorgânicos, mas a sua maior utilidade é no estudo de biomoléculas ou de compostos com alto grau de polimerização. Geralmente o empacotamento da coluna para este método é feito por polímeros e partículas de sílica, ambos com diâmetro de 5 a 10  $\mu\text{m}$  [177, 178].

Por último, a cromatografia de partilha é um dos processos de HPLC mais comum na separação de pequenas moléculas orgânicas. A separação baseia-se, essencialmente, na distribuição (solubilidade relativa) dos analitos entre os líquidos que constituem a fase estacionária e a fase móvel. Os componentes da amostra que são mais solúveis na fase móvel são eluídos primeiro, enquanto os que têm maior afinidade para com a fase estacionária são seletivamente retidos por ela [175, 177]. No caso da fase estacionária ser polar e a fase móvel apolar, a cromatografia diz-se em fase normal. No entanto, se a fase estacionária for apolar (hidrofóbica) e a fase móvel polar, a cromatografia diz-se em fase inversa. Em fase normal, os analitos mais polares são os mais retidos e os últimos a sair da coluna cromatográfica, enquanto que na cromatografia em fase inversa os analitos mais retidos são os de natureza não polar [119].

Como referido anteriormente, na cromatografia líquida são utilizados vários tipos de fases estacionárias, sendo as mais usadas atualmente as quimicamente modificadas. No caso das separações em mecanismos de partilha, a sílica quimicamente modificada é muito usada como fase estacionária e os solventes polares como fase móvel. Tal como nos sorventes de SPE e MEPS, as partículas de sílica encontram-se ligadas a grupos funcionais de C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub>, mas também a grupos fenilo (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), cianopropilo (CN) ou aminopropilo (NH<sub>2</sub>). A natureza da fase ligada é um parâmetro determinante para as propriedades de separação do sistema cromatográfico [119].

### 2.3.1.2. Detetores

Diversos detetores podem ser utilizados em HPLC. Os mais frequentes são os espectrofotómetros de ultravioleta/visível (UV-Vis), incluindo os detetores de matriz de díodos (DAD). Para além deste, a deteção pode ser feita por fluorimetria, refratometria diferencial, por métodos eletroquímicos, espectrometria de massa (MS), infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN), bem como por outros métodos particulares [119].

O detetor ideal é aquele que apresenta as seguintes características [176, 179]:

- Alta sensibilidade para detetar pequenas quantidades de amostra;
- Deve ser estável e insensível a variações de temperatura e de fluxo, no caso de eluições com gradiente;
- O sinal deve manter uma relação linear com a concentração da amostra;
- Deve efetuar uma leitura contínua.

O detetor de UV-Vis é um dos mais populares, apesar de muitas substâncias orgânicas não absorverem radiação ultravioleta [119]. Este baseia-se na absorção de luz ultravioleta ou visível, por parte da amostra quando nela passa radiação eletromagnética. É um detetor seletivo para moléculas que possuem cromóforos. Os fotómetros de comprimento de onda fixo, os espectrofotómetros e os detetores por arranjo de fotodiodos são os três tipos de equipamentos que operam de acordo com este princípio [180].

Os fotómetros de comprimento de onda fixo têm a sua aplicação restrita a moléculas que absorvam no comprimento de onda em que eles trabalham. Por outro lado

os espectrofotômetros são mais versáteis, pois permitem a escolha do comprimento de onda mais adequado a cada análise <sup>[180]</sup>.

Os detetores de arranjo de fotodiodos (PDA) fornecem espectros no UV-Vis do eluente da coluna em determinados intervalos de tempo. Este tipo de detetores emprega um sistema de ótica reversa, isto é, a rede de difração é colocada entre a amostra e o detetor e não entre a fonte de radiação e a amostra. Assim sendo, no PDA a radiação policromática incide sobre a amostra e é, então, dispersa num monocromador fixo em diferentes comprimentos de onda que são monitorados simultaneamente pelos díodos. Esta configuração com monocromador fixo traz algumas vantagens, possibilitando ao espectrofotómetro PDA tanto adquirir um espectro sem distorções e em poucos milissegundos como medir os comprimentos de onda com alta repetibilidade <sup>[181]</sup>.

Outro fator importante para estes detetores é o facto de terem sensibilidades diferentes para diferentes comprimentos de onda, operando entre os 190 e os 500 nm, de modo que é necessário que se especifique em que região do espectro se vai trabalhar, mas a resolução espectral depende do tipo e do número de díodos que compõe o arranjo <sup>[175]</sup>. É recomendado a utilização do comprimento de onda máximo do analito, desde que este seja superior a 220 nm, pois abaixo deste valor geralmente observa-se interferência da fase móvel. Na **Tabela 5** encontram-se descritos os comprimentos de onda mínimos para que não se observe interferência da fase móvel <sup>[180]</sup>.

**Tabela 5.** Comprimento de onda dos solventes mais utilizados.

Solvente	UV (nm) mínimo
Acetona	330
Acetonitrilo	200
Benzeno	280
Clorofórmio	245
Ciclohexano	210
Dimetil sulfóxido	270
Etanol	210
Acetato de etilo	255
Hexano	200
Metanol	210
Água	190

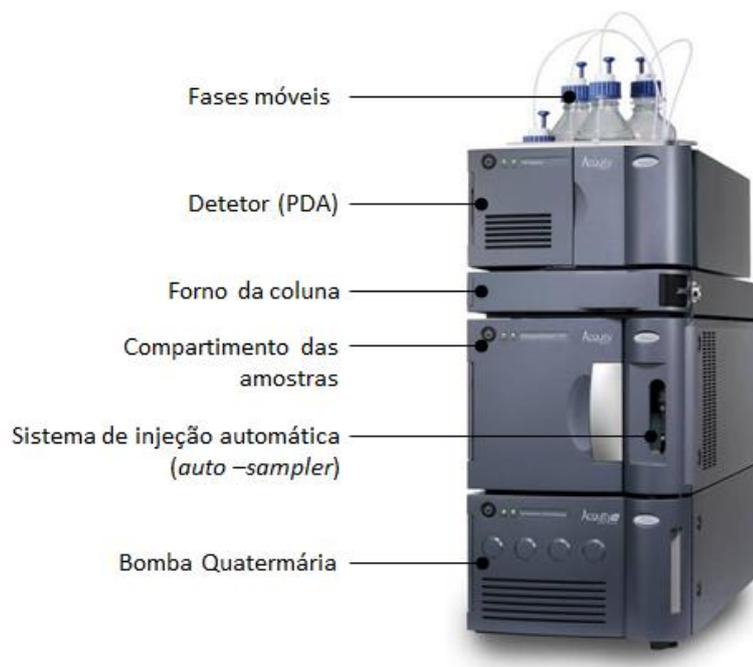
Embora alguns eluentes possibilitem a análise em comprimentos de onda mais baixos, sugere-se a utilização do comprimento de onda de um cromóforo mais fraco, num comprimento de onda mais alto.

Apesar de serem cada vez mais frequentes os detetores que fornecem dados espectrais sobre os compostos em análise, como acontece com os detetores de massas que, para além de serem universais, permitem obter o espectro de massa de cada um dos analitos detetados, o detetor de PDA é um equipamento acessível à maioria dos laboratórios e tem sido projetado para uma gama de aplicações laboratoriais, incluindo deteção e quantificação de traços de impurezas, identificação de compostos e desenvolvimento de métodos <sup>[182]</sup>.

### **2.3.2. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC)**

O HPLC é uma técnica de separação bem estabelecida sendo empregada nas mais diversas áreas, entre elas, química, forense, toxicológica, clínica e ambiental, para solucionar inúmeros problemas analíticos. Durante os últimos anos, muitas melhorias vêm sendo incorporadas a esta técnica, como desenvolvimentos de novas fases estacionárias e suportes cromatográficos, avanços na instrumentação, entre outros, permitindo que análises mais rápidas e mais eficientes sejam alcançadas, corroborando com a necessidade atual de aumentar o número de análises e o rendimento e reduzir os custos <sup>[183]</sup>.

Em 2004, a ciência de separação analítica foi revolucionada com a introdução da cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC) <sup>[184]</sup> (**Figura 17**).



**Figura 17.** Esquema representativo de um UHPLC.

Esta técnica fundamenta-se nos mesmos princípios de separação do HPLC, sendo que a instrumentação do UHPLC (bombas, injetores e detetores) apresenta maior capacidade de funcionamento a pressões acima dos 1000 bar (15000 psi). Este sistema foi introduzido e adaptado às necessidades atuais, uma vez que permite o uso de colunas com um comprimento mais reduzido (5-10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1-2,1 mm), assim como fases estacionárias constituídas por partículas menores (diâmetro inferior a 2  $\mu\text{m}$ ), proporcionando um novo nível de performance cromatográfica [174, 184]. Além disso, o consumo de solvente é relativamente inferior e o fluxo aplicado para a passagem das amostras pela fase estacionária pode ser mais elevado. A combinação do tamanho das partículas com as altas velocidades lineares da fase móvel permite um aumento da resolução e uma maior sensibilidade de deteção dos analitos presentes na amostra. Todas estas vantagens vieram contribuir para uma redução do tempo de análise, uma das principais dificuldades no HPLC [185-187].

Desde a introdução do primeiro equipamento de UHPLC pela Waters Corporation, em 2004, denominado de ACQUITY UPLC® *System*, que permitiu que a técnica fosse empregue para além do meio académico e avaliada por diferentes usuários. O UHPLC vem, desde então, ganhando espaço em todas as áreas de aplicação do HPLC, em decorrência das suas principais vantagens. Além disso apresenta economia na fase

estacionária e fase móvel, menor volume de amostra, facilidade de transferência de um método desenvolvido por HPLC para UHPLC, grande variedade de colunas, de equipamentos e de detetores disponíveis comercialmente e também apresenta a capacidade de gerar menores quantidades de resíduos atendendo, desta forma à Química Verde <sup>[183]</sup>.

Esta técnica veio despertar interesse na quantificação de compostos em análises farmacêuticas, biomédicas, ambientais e alimentares, destacando-se como um futuro promissor da cromatografia líquida <sup>[187, 188]</sup>.

Relativamente ao estudo de ADs, vários trabalhos têm sido reportados empregando o sistema UHPLC como método analítico. Em 2010 Nielsen *et al.* (2010)<sup>[189]</sup> realizaram a quantificação de 52 compostos (fármacos, incluindo ADs, e drogas de abuso) em amostras de cabelo, utilizando um UPLC-TOF-MS (cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa com tempo de voo). As condições de UPLC-TOF utilizadas foram uma modificação do método descrito por Lee *et al.* (2009)<sup>[190]</sup>, sendo a separação cromatográfica realizada com uma coluna HSS T3 C<sub>18</sub> a 35°C e uma fase móvel composta por uma solução aquosa (contendo 0,05% de ácido fórmico) e metanol a um fluxo de 0,3 mL/min. Os autores verificaram que o método validado forneceu boa eficiência de extração para os analitos estudados; no entanto, o componente TOF do UPLC mostrou ser menos adequado para a quantificação de moléculas de baixo peso molecular, como a anfetamina, devido à falta de linearidade e baixa sensibilidade causada por ruído de fundo elevado. Apesar disso, o método continua a ser útil para o rastreio dos compostos analisados.

Recentemente, em 2014, Chambers *et al.* (2014)<sup>[191]</sup> propuseram uma metodologia rápida, sensível e robusta por UPLC-MS/MS (cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem) para a monitorização de vários TCA em amostras de urina. As melhores condições cromatográficas foram obtidas com uma coluna BEH C<sub>18</sub> a 35°C, utilizando uma solução aquosa com 0,1% de hidróxido de amónio e acetonitrilo como fases móveis, a um fluxo de 0,6 mL/min. Chambers e restantes autores concluíram que a combinação da SPE em modo misto, como técnica de preparação de amostra, com a velocidade e sensibilidade do UPLC, facilitou o rápido desenvolvimento de um método bioanalítico robusto, altamente sensível e rápido. A aplicação do método validado a amostras de pacientes, produziu resultados positivos em

6 das amostras analisadas. No mesmo ano Montesano *et al.* (2014)<sup>[192]</sup> apresentaram um estudo de 96 compostos de diversas classes, incluindo ADs, em amostras de cabelo, utilizando o mesmo sistema cromatográfico que Chambers *et al.* (2014)<sup>[191]</sup>. As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas utilizadas no trabalho descrito por Rosano *et al.* (2011)<sup>[193]</sup>, nomeadamente, uma coluna HSS C<sub>18</sub> a 50 °C e usando formato de amónia (5mM, pH 3,0) e uma solução de acetonitrilo contendo 0,1% de ácido fórmico como fases móveis, a um fluxo de 0,4 mL/min. Segundo os autores, o método apresenta um amplo potencial na análise de amostras de cabelo, uma vez que o intervalo de análise permite a adição de novos analitos devido à versatilidade do processo de extração e do sistema cromatográfico.

A **Tabela 6** proporciona uma visão geral dos trabalhos publicados entre 2006 e 2015, que recorrem a técnicas cromatográficas para análise dos ADs em estudo em diferentes fluidos biológicos.

**Tabela 6.** Métodos analíticos para a determinação dos ADs em estudo em fluidos biológicos.

Analitos	Amostra (volume)	Técnica de preparação da amostra	Método analítico	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperação (%)	Ref.
FLX NORFLX	Urina (5 mL)	SPE	GC-MS	$5,7 \times 10^{-3}$ $4,9 \times 10^{-3}$	95,2 – 106,1	[113]
FLX NORFLX	Urina (3 mL)	SPME	HPLC-DAD	0,010 0,010	-	[52]
CLP	Urina (5 mL)	DLLME	HPLC-UV	$7 \times 10^{-3}$	97	[194]
FLX CLP DESCLP	Saliva (1 mL)	SPE	LC-MS/MS	76,4 63,2 51,5	-	[195]
FLX	Plasma (400 $\mu\text{L}$ )	MEPS	LC-UV	-	92 - 97	[151]
FLX	Plasma (1 mL)	HF-LPME	HPLC-FD	-	70,9	[196]
CLP DESCLP	Sangue (500 $\mu\text{L}$ ) (100 $\mu\text{L}$ )	LLE PPT	HPLC-DAD LC-QTOF-MS	-	-	[197]
CLP	Urina (2,1 mL)	EME	GC-FID	$0,75 \times 10^{-3}$	89	[198]
CLP	Sangue (500 $\mu\text{L}$ )	QuEChERS	LC-MS/MS	$0,73 \times 10^{-3}$	82	[170]
FLX	Plasma (200 $\mu\text{L}$ )	SPE	LC-MS/MS	-	91,8 – 94,8	[199]
FLX	Plasma (100 $\mu\text{L}$ )	Injeção direta	UPLC-MS/MS	-	92,2 – 93,8	[200]

**Abreviaturas:** CLP – clomipramina; DESC LP – desmetilclomipramina; DLLME – microextração líquido-líquido dispersiva; EME – Extração por eletromembrana; FLX – fluoxetina; GC-FID – cromatografia gasosa acoplada ao detetor de ionização de chama; GC-MS – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa; HF-LPME – microextração de fase líquida baseada em fibra oca; HPLC-DAD – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de díodos; HPLC-FD – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detetor de fluorescência; HPLC-UV – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor ultravioleta; LC-MS/MS – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem; LC-QTOF-MS – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa com híbrido quadrupolo de tempo de voo; LC-UV – cromatografia líquida acoplada a um detetor ultravioleta; MEPS – microextração por sorvente empacotado; LLE – extração líquido-líquido; NORFLX – norfluoxetina; PPT – precipitação de proteínas; SPE – extração em fase sólida; QuEChERS – *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*; SPME – microextração em fase sólida; UPLC-MS/MS – cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massa em tandem.

# **CAPÍTULO III**

## **3. Objetivo do Trabalho**



## CAPÍTULO III – OBJETIVO DO TRABALHO

### 3.1. JUSTIFICAÇÃO DO TEMA E OBJETIVO DO ESTUDO

As doenças mentais são doenças de etiologia complexa, abrangendo alterações ao nível da cognição, das emoções e do controlo comportamental. De acordo com o “Estudo Epidemiológico Nacional de Morbilidade Psiquiátrica: Prevalência, fatores de risco, carga social e económica e utilização de serviços”, - Portugal apresenta-se como o país da Europa com maior prevalência de doenças mentais. Em 2009, um em cada cinco portugueses sofreu de uma doença psiquiátrica (23%) e aproximadamente metade (43%) já teve uma destas perturbações durante a vida <sup>[201]</sup>.

As desvantagens sociais, períodos de crise económica e mudanças adversas no estatuto socioeconómico são fatores que levaram a um aumento considerável do consumo de antidepressivos ao longo da última década. O facto de serem bastante comercializados, não só através de farmácias mas também de forma ilegal, tem contribuído para o aumento dos casos de etiologia médico-legal suicida.

Devido a fatores como o uso irracional de medicamentos devido à prescrição, dispensa ou venda inapropriada, e à toma inadequada dos medicamentos por parte dos pacientes, torna-se fundamental realizar um rastreio destas substâncias. Assim sendo, e tendo em conta o risco de intoxicação advém a necessidade de elucidação de novas técnicas que permitam fazer um controlo mais rigoroso dos níveis de tais fármacos em fluidos biológicos. Com essa atitude interventiva, poderá ser exequível conciliar o avanço da tecnologia com os objetivos de uma prática clínica de excelência.

O presente trabalho teve, assim, como objetivo desenvolver e validar duas metodologias analíticas para a determinação da fluoxetina e da clomipramina, dois antidepressivos de gerações diferentes em amostras de urina, baseadas nas mais recentes técnicas de extração, a microextração por sorvente empacotado (MEPS) e o QuEChERS e posterior análise por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao detetor de fotodiodos (UPLC-PDA). Deste modo, as metodologias desenvolvidas poderão ser aplicadas de futuro tanto em contexto clínico como forense.



# **CAPÍTULO IV**

## **4. PARTE EXPERIMENTAL**



## **CAPÍTULO IV - PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.1. PADRÕES E REAGENTES**

O padrão analítico de cloridrato de fluoxetina (grau de pureza 98%) foi obtido através da Cayman Chemicals (Michigan, EUA); o cloridrato de desmetilclomipramina (grau de pureza 99,7%) foi adquirido à LGC (Luckenwalde, Alemanha) e a norfluoxetina (grau de pureza 99%) e o cloridrato de clomipramina foram ambos obtidos através da Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg, Alemanha). A clozapina (usada como padrão interno) (grau de pureza 98%) foi fornecida pela Cayman Chemicals (Michigan, EUA).

Os solventes orgânicos como o metanol, acetonitrilo e acetato de etilo foram fornecidos pela Fisher Scientific (Loughborough, Reino Unido) e o ácido fórmico 98% P.A. foi adquirido à Panreac (Barcelona, Espanha).

A água ultra pura utilizada ao longo deste trabalho apresenta uma resistividade mínima de  $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$  à temperatura ambiente, tendo sido produzida num sistema de purificação de água Milli-Q da Millipore (Bedford, EUA).

Os sais utilizados no procedimento do QuEChERS, nomeadamente o cloreto de sódio (grau de pureza 99,8%), o sulfato de magnésio anidro (grau de pureza 99,5%), o citrato de trisódio dihidratado (grau de pureza 99%) e o hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado (grau de pureza 99%) foram adquiridos à Sigma-Aldrich Corporation (Steinheim, Alemanha).

### **4.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS**

Para a preparação de soluções e processamento das amostras, foram utilizados os seguintes equipamentos: agitador de vórtex, modelo Maxi Mix Plus™ da Thermolyne; balança analítica, modelo PA114 da OHAUS® Pioneer™; centrifugadora, modelo Sigma 1-6P da Sigma Laborzentrifugen; medidor de pH, modelo 691 pH meter da Metrohm; placa de agitação, modelo MR 3001 da Heidolph e seringa analítica automatizada, modelo eVol® XR da SGE Analytical Science.

As amostras foram analisadas utilizando um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência da Waters Acquity UPLC H-Class (Mildford, MA, EUA) equipado com detetor de fotodiodos, modelo 2996 da Waters (Mildford, MA, EUA), e operado a partir

do software Empower 2 (Waters Corporation). Foi usada uma coluna analítica Acquity UPLC® HSS T3 (100 mm × 2,1 mm, 1,8 µm de diâmetro da partícula) e uma pré-coluna VanGuard™ (5 mm × 2,1 mm, 1,8 µm de diâmetro da partícula) da Waters.

Foi utilizado material de uso corrente como materiais de vidro para medições volumétricas (balões volumétricos e pipetas) de classe A da Labbox, micropipetas da Orange Scientific, modelos Tipor V+ e Tipor VN, (calibradas por gravimetria periodicamente) de diferentes capacidades máximas, variando entre 2 µL e 10000 µL e as pontas descartáveis usadas nas micropipetas são da Gilson® Frilabo.

As amostras biológicas, nomeadamente de urina, foram colhidas em frascos de plástico esterilizados com dispositivo de transferência integrado de capacidade máxima 100 mL e transferidas para tubos de urina de capacidade 10,5 mL da Vacuette®. As amostras foram filtradas com o auxílio de seringas de plástico de capacidade máxima 20 mL e filtros de seringa 0,22 µm de politetrafluoretileno (PTFE) hidrofílicos da BGB®. A urina filtrada foi distribuída em alíquotas de 2 mL para tubos de microcentrífuga estéreis da BIOplastics BV.

Os sorventes, contendo as fases estacionárias, utilizados na seringa analítica eVol® XR foram obtidos à SGE Analytical Science e à Fisher Scientific. Os vials de 1,5 mL de capacidade e os insertos de 250µL cónicos de vidro, onde foram colhidos os extratos após MEPS, foram adquiridos à Waters (Mildford, MA, EUA).

Para a metodologia por QuEChERS, foram utilizados tubos falcon® de fundo cónico, esterilizados, graduados, com tampa de rosca de capacidades 15 mL e 50 mL, fornecidos pela VWR® (Carnaxide, Portugal). Os tubos *clean up* DisQuE™ de capacidade 2 mL, tampa verde contendo 150 mg MgSO<sub>4</sub>, 25 mg PSA e 25 mg C<sub>18</sub> foram adquiridos à Waters (Mildford, MA, EUA).

As fases móveis usadas na cromatografia líquida foram filtradas a vácuo por um sistema de filtração All-Glass da Millipore e armazenadas em frascos de vidro de borosilicato, da VWR® (Carnaxide, Portugal).

#### **4.3. PREPARAÇÃO DE PADRÕES, SOLVENTES E SOLUÇÕES**

Foram preparadas soluções padrão em metanol na concentração final de 1000 µg/mL dos padrões individuais das substâncias, incluindo o padrão interno, tendo sido

posteriormente armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ao abrigo da luz. Por diluição destas soluções padrão prepararam-se soluções de trabalho a  $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ , em metanol.

Para a otimização dos dois métodos (MEPS e QuEChERS), prepararam-se soluções de trabalho a  $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ , numa amostra de urina branca, tendo sido depois armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ao abrigo da luz.

Para a construção da curva de calibração, foram preparadas soluções de diferentes concentrações (de  $0,1$  a  $5,0\text{ }\mu\text{g/mL}$ ), por diluição das soluções de trabalho numa amostra de urina branca. As gamas de concentração foram selecionadas de acordo com a dose terapêutica e da sensibilidade do UHPLC-PDA.

Para a preparação de água contendo  $0,1\%$  de ácido fórmico ( $\text{H}_2\text{O}$  ( $0,1\%$  FA)) ( $250\text{ mL}$ ), adicionou-se  $250\text{ }\mu\text{L}$  de ácido fórmico a  $250\text{ mL}$  de água ultra pura.

A solução metanol/ acetonitrilo ( $80:20$ , v/v) ( $100\text{ mL}$ ) foi preparada adicionando  $80\text{ mL}$  de metanol a  $20\text{ mL}$  de acetonitrilo.

A solução de água contendo  $0,1\%$  de ácido fórmico/ acetonitrilo ( $90:10$ , v/v) ( $100\text{ mL}$ ) foi preparada através da adição de  $90\text{ mL}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  ( $0,1\%$  FA) e de  $10\text{ mL}$  acetonitrilo.

Para a preparação da solução de água contendo  $0,1\%$  de ácido fórmico/ metanol ( $90:10$ , v/v) ( $100\text{ mL}$ ), adicionou-se  $10\text{ mL}$  de metanol a  $90\text{ mL}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  ( $0,1\%$  FA).

Todas as soluções foram filtradas a vácuo por um sistema de filtração All-Glass da Millipore.

#### **4.4. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE URINA**

As amostras de urina utilizadas no decorrer deste trabalho como amostras brancas foram obtidas de voluntários do Centro de Química da Madeira (CQM), não consumidores de ADs.

As amostras provenientes de pacientes da Casa de Saúde S. João de Deus do Funchal (ISJD), foram colhidas em frascos de plástico esterilizados, com dispositivo de transferência integrado (Vacurette®), e posteriormente transportadas para o laboratório do CQM, numa caixa térmica apropriada para o transporte de amostras biológicas.

Tanto as amostras brancas como as amostras de pacientes foram transferidas usando tubos para urina de capacidade máxima  $10,5\text{ mL}$  da Vacurette® (tubos de plástico com um vácuo pré-definido para aspiração exata de volume) e depois centrifugadas a

5000 rpm, durante 20 minutos. O sobrenadante foi, posteriormente, filtrado com filtros de seringa 0,22 µm PTFE, distribuído em alíquotas de 2 mL, em tubos de microcentrífuga estéreis e armazenados a -20°C.

#### **4.5. METODOLOGIA ANALÍTICA**

A extração das substâncias em estudo na urina foi realizada recorrendo a duas técnicas de extração, MEPS e QuEChERS, seguida da análise por UHPLC-PDA.

De seguida, serão descritos os procedimentos de cada técnica de extração utilizada, assim como as condições cromatográficas utilizadas.

##### **4.5.1. Processo de Extração MEPS**

De modo a selecionar as melhores condições para a extração dos ADs em estudo, foram testadas diversas variáveis que podem afetar a performance da MEPS. Fatores como a natureza do sorvente, o volume de amostra, o número de ciclos de extração, o solvente de eluição e o respetivo volume e pH da amostra foram otimizados (ver **Capítulo V**), usando um design experimental univariado, para estabelecer o equilíbrio de partição dos analitos em tempos mais curtos de análise e obter a sensibilidade adequada para a análise destes por UHPLC-PDA.

O processo de otimização foi realizado em triplicado e todos os ensaios foram efetuados com recurso a uma seringa analítica automática eVol® XR.

As condições ótimas foram selecionadas pela totalidade das áreas dos picos de cada antidepressivo, obtidos em cada parâmetro.

##### **4.5.1.1. Procedimento de Extração MEPS Otimizado**

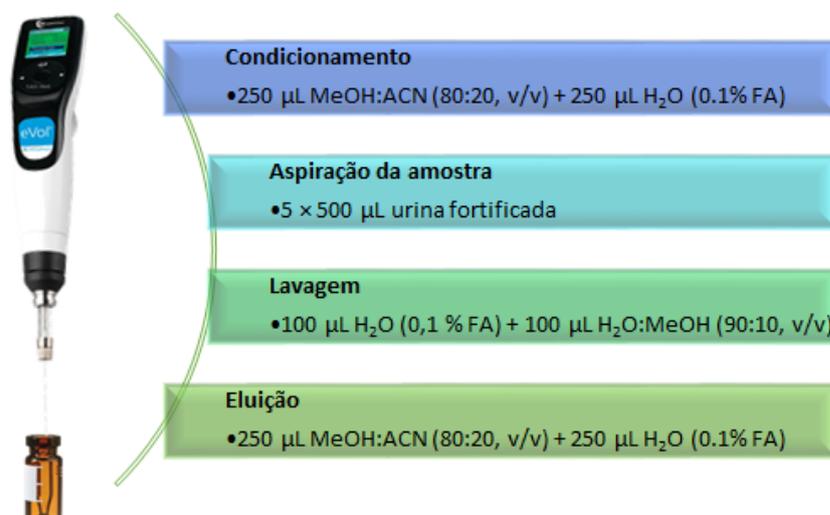
Antes do primeiro ensaio, o sorvente de extração foi condicionado com 250 µL da solução metanol/ acetonitrilo (80:20, v/v), seguido de 250 µL de H<sub>2</sub>O (0,1% FA). Posteriormente, procedeu-se à passagem de 500 µL de uma amostra branca de urina fortificada com solução padrão das substâncias em estudo (10 µg/mL). Esta foi aspirada através do sorvente e dispensada no mesmo vial cinco vezes a uma velocidade de cerca de 20 µL/s. A lavagem foi realizada pela passagem de 100 µL H<sub>2</sub>O (0,1% FA), seguida de 100 µL de uma solução de H<sub>2</sub>O (0,1% FA)/ metanol (90:10) de forma a remover os

compostos interferentes. Os analitos foram eluídos, por duas vezes, com 500  $\mu\text{L}$  da solução metanol/ acetonitrilo (80:20, v/v).

Por fim, o extrato obtido foi evaporado até à secura sob corrente de azoto, ao qual se adicionou 100  $\mu\text{L}$  da fase móvel de entrada ( $\text{H}_2\text{O}$  (0,1% FA)/acetonitrilo, 90:10, v/v). Uma alíquota de 2  $\mu\text{L}$  foi, então, injetada no sistema cromatográfico UHPLC-PDA.

Importa referir que para prolongar o tempo de vida do sorvente, se procedeu a uma lavagem com 250  $\mu\text{L}$  da solução metanol/ acetonitrilo (80:20, v/v), seguido de 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  (0,1% FA). Este procedimento permitiu que o “efeito de memória” (*carry-over*) fosse reduzido e que o sorvente ficasse condicionado para a próxima extração.

Na **Figura 18** encontra-se apresentado o esquema do procedimento MEPS otimizado.



**Figura 18.** Esquema do procedimento MEPS otimizado com recurso à eVol®.

#### 4.5.2. Processo de Extração QuEChERS

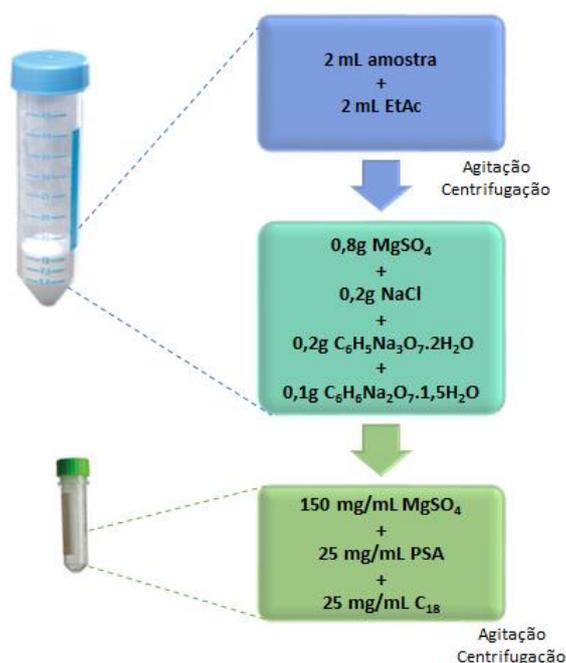
Tal como no procedimento MEPS, na técnica extrativa por QuEChERS foi igualmente necessária a otimização, tendo sido testados vários parâmetros importantes, tais como volume de amostra, solvente e sais de extração e influência da etapa do *clean up* (ver **Capítulo V**).

O processo de otimização foi realizado em triplicado e as melhores condições foram selecionadas pela totalidade das áreas dos picos de cada antidepressivo, obtidos em cada parâmetro. Para testar cada variável, partiu-se da metodologia original proposta por Anastassiades *et al.* (2003)<sup>[153]</sup>.

#### 4.5.2.1. Procedimento de Extração QuEChERS Otimizado

O procedimento foi realizado com a adição de 2 mL de acetato de etilo (EtAc) a 2 mL de amostra branca de urina, fortificada com uma solução padrão das substâncias em estudo (10 µg/mL), num tubo falcon® de 15 mL. Agitou-se, manualmente, durante 15 s e, posteriormente, através de agitação mecânica, com auxílio do vórtex durante 1 min, de modo a assegurar a interação do solvente com toda a amostra de urina. De seguida, adicionou-se 0,2 g de NaCl, 0,8 g de MgSO<sub>4</sub>, 0,2 g de citrato de trisódio dihidratado (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O) e 0,1 g de hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·1,5H<sub>2</sub>O), ao tubo com a mistura homogeneizada e foi repetida a agitação. O tubo foi centrifugado a 3000 rpm, durante 5 min e cerca de um 1 mL de sobrenadante foi transferido para um tubo de *clean up* de capacidade de 2 mL, contendo 150 mg de MgSO<sub>4</sub>, 25 mg de PSA e 25 mg de C<sub>18</sub>. Repetiu-se a etapa de agitação e o tubo foi centrifugado a 5000 rpm durante 3 min. Por fim o sobrenadante obtido foi evaporado à secura, sob corrente de azoto, ao qual se adicionou 100 µL da fase móvel de entrada (H<sub>2</sub>O (0,1% FA)/acetonitrilo, 90:10, v/v). Uma alíquota de 2 µL foi, então, injetada no sistema cromatográfico UHPLC-PDA.

Na **Figura 19** encontra-se apresentado o esquema do procedimento QuEChERS modificado.



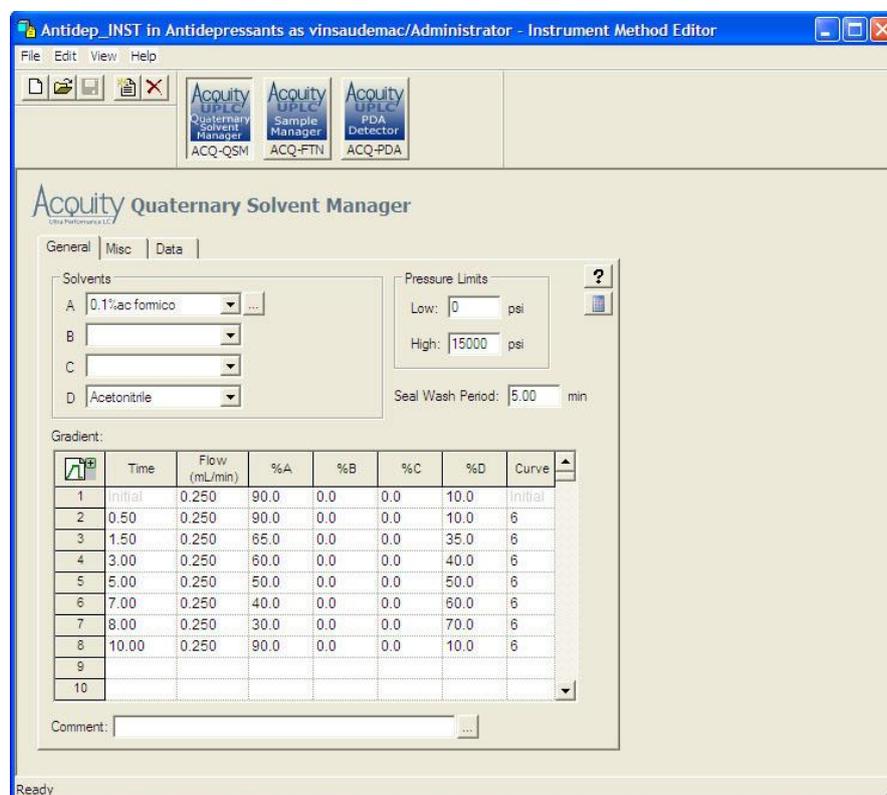
**Figura 19.** Esquema da metodologia QuEChERS modificado e otimizado.

### 4.5.3. Condições Cromatográficas

As análises cromatográficas foram efetuadas num equipamento de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) da Waters, modelo Acquity UPLC H-Class, equipado com um sistema de bombas quaternário com módulo de desgaseificação integrado, um amostrador automático, um forno de colunas e acoplado a um detetor de fotodiodos (PDA, modelo 2996). Todo o sistema foi controlado a partir do software Empower 2 (Waters Corporation).

As condições cromatográficas foram otimizadas utilizando uma coluna analítica de fase reversa Acquity UPLC® HSS T3 1,8  $\mu\text{m}$  (100 mm  $\times$  2,1 mm) e uma pré-coluna VanGuard™ 1,8  $\mu\text{m}$  (5 mm  $\times$  2,1 mm).

A fase móvel utilizada foi constituída por solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% e acetonitrilo com um fluxo constante de 0,250 mL/min. Durante cada corrida (10 minutos) foi utilizado o gradiente de fase móvel apresentado na **Figura 20**, o que permitiu uma adequada separação cromatográfica dos compostos. As temperaturas da coluna e do compartimento das amostras foram igualmente estabelecidas, sendo 30°C e 20°C respetivamente.



**Figura 20.** Gradiente de fase móvel do UHPLC-PDA usado na separação das substâncias em estudo.

Foram estabelecidos três canais diferentes, nomeadamente, 227, 239 e 252 nm, que correspondem ao comprimento de onda máximo de cada composto, incluindo o PI, para a deteção das substâncias em estudo.

#### **4.6. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS**

A fiabilidade dos resultados analíticos é um pré-requisito para uma correta interpretação dos resultados toxicológicos na avaliação dos estudos científicos, bem como no trabalho de rotina. Em qualquer das situações, os dados pouco fiáveis podem levar a super ou subestimação dos efeitos, a falsas interpretações e a conclusões indevidas, que por sua vez podem resultar no tratamento errado do paciente ou na contestação em tribunal nos casos judiciais. Deste modo, a utilização de novas técnicas exige um desenvolvimento rigoroso e uma validação minuciosa do método [202].

A validação de um método analítico torna-se, assim, uma etapa fulcral, uma vez que permite que o laboratório possa implementar e cumprir rigorosos critérios de qualidade. Diversos critérios são avaliados de modo a comprovar a adequação da metodologia para as análises estudadas, nas condições avaliadas. Este processo garante, assim, qualidade e idoneidade do método, tomando como corretas as suas especificações e dando credibilidade aos resultados obtidos [203].

A conformidade da metodologia deve ter alguns parâmetros obrigatórios, tais como seletividade, precisão, exatidão, linearidade/curva de calibração, limites de deteção e de quantificação, recuperação e efeito de matriz. No presente trabalho, ambas as metodologias MEPS/UHPLC-PDA e QuEChERS/UHPLC-PDA, foram validadas nestes parâmetros seguindo as normas da Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal (Relacre) [204] e de guias internacionais como a *Food and Drug Administration* (FDA) [205] e o *International Conference on Harmonisation* (ICH) [206].

##### **4.6.1. Seletividade**

A seletividade de um método experimental de separação pode ser definida como a capacidade para distinguir o(s) analito(s) de interesse de forma inequívoca numa matriz complexa, sem a interferência de outros elementos eventualmente presentes na amostra [207].

O termo seletividade pode ser muitas vezes confundido com especificidade. Um método instrumental que fornece uma resposta para um único analito é designado de específico e aquele que responde a diversos analitos, mas que consegue distinguir a resposta de um analito de todas as outras respostas, será denominado de seletivo [207].

Dado que há poucos métodos cromatográficos que respondem a apenas uma substância, segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) [208], o termo seletividade torna-se mais apropriado.

A fim de provar que o método é seletivo, a ausência de sinais interferentes tem de ser demonstrada [209]. Para tal, selecionaram-se amostras de urina provenientes de diferentes voluntários saudáveis. O estudo envolveu um total de vinte amostras, isentas dos analitos em estudo, as quais foram denominadas de amostras brancas. As 20 amostras colhidas foram misturadas de forma aleatória em grupos de 4, constituindo-se assim 5 misturas (*pools*). Cada um dos *pools* foi dividido em duas alíquotas de urina (2,5 mL). A uma das alíquotas apenas se adicionou o PI na concentração de 2,5 µg/mL, enquanto que a segunda alíquota foi fortificada com uma mistura padrão dos antidepressivos em estudo, incluindo o PI, à concentração de 2,5 µg/mL. A ambas foram aplicados os dois métodos desenvolvidos, MEPS/UHPLC-PDA e QuEChERS/UHPLC-PDA. Os cromatogramas obtidos foram então comparados, avaliando-se a existência, ou não, de interferentes nos tempos de retenção dos diferentes analitos.

#### 4.6.2. Linearidade

A linearidade de um método analítico corresponde à capacidade deste produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, numa determinada faixa de concentrações [210]. É recomendável que este estudo seja feito com pelo menos 5 concentrações distintas [211].

Para a maioria das técnicas analíticas, a linearidade é expressa através da correlação entre a resposta do equipamento (p. ex. área ou altura do pico cromatográfico) e a concentração do analito. Essa correlação pode ser representada matematicamente pela curva de calibração e expressa pela equação de regressão linear:

$$y = ax + b \quad \text{(equação 1)}$$

Onde:

$y$  é a resposta do equipamento,  $a$  o declive da reta,  $x$  a concentração do analito e  $b$  a ordenada na origem.

Esta expressão matemática foi depois utilizada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real.

Os parâmetros da regressão obtidos pelo método dos mínimos quadrados (o declive, a ordenada na origem e o coeficiente de correlação) traduzem a relação linear dos dados experimentais, permitindo extrair informação sobre o método analítico. Os coeficientes de correlação linear ( $R$ ) e de determinação ( $R^2$ ) são utilizados para traduzir a adequabilidade de um modelo linear aos valores experimentais, devendo ser próximos de 1 de forma a garantir um melhor ajuste dos resultados (menor dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor incerteza dos coeficientes de regressão estimados) <sup>[212]</sup>.

#### **4.6.2.1. Padronização**

A construção da curva de calibração pode ser realizada por padronização interna, externa ou ainda por adição de padrão. A padronização externa é utilizada para amostras que não precisam de um pré-tratamento extenso. Os padrões de calibração são obtidos pela adição de concentrações conhecidas do analito na matriz e ao ser aplicado para análises de amostras desconhecidas, compara-se a área do pico do analito a ser quantificado com as áreas obtidas a partir dos padrões de calibração <sup>[213-215]</sup>. No entanto a padronização interna foi o método selecionado para este trabalho, consistindo na preparação de padrões de calibração contendo diferentes concentrações do analito, nos quais se adiciona uma concentração fixa de padrão interno (PI). Este método permite avaliar a variação da resposta em função de manipulações da amostra (p. ex. concentração, extração, preparo da amostra), sendo o método de escolha para análises em matrizes biológicas, quando não se trabalha com injeção direta de amostras. Neste tipo de padronização, o modelo de regressão e o gráfico são elaborados pela relação entre a razão das áreas (área do analito/área do PI) com as concentrações do analito. Na aplicação do método, as amostras desconhecidas são analisadas após a adição da mesma quantidade do padrão interno <sup>[213]</sup>.

Na cromatografia líquida, o PI é muito utilizado para compensar as diferenças entre análises, sobretudo da eficiência da extração e da reprodutibilidade entre injeções [211]. Este deverá ser quimicamente semelhante aos analitos que se pretendem analisar, ser altamente puro e não deve reagir com nenhum dos componentes da amostra. Além disso, devemos nos certificar que o pico referente ao padrão interno se encontra bem resolvido dos demais picos dos componentes da amostra e eluir próximo ao sinal do analito [216]. Preferencialmente, são escolhidos padrões deuterados como padrões internos, por serem compostos que não existem na natureza, nem existirão na amostra biológica, a não ser que sejam adicionados à mesma e por serem o mais semelhante possível aos analitos. No entanto, devido ao facto dos ADs em estudo apresentarem diferenças estruturais, e uma vez que os padrões deuterados são mais dispendiosos, testou-se inicialmente a clonidina, um anti-hipertensor como PI. Esta escolha teve em conta os trabalhos de Hassan [217], de Vecchione *et al.* (2012)[218], entre outros, onde usaram a clonidina como PI na determinação e quantificação de diversos fármacos psicotrópicos, incluindo os ADs. Porém, os resultados não foram satisfatórios, visto que não se obteve uma boa eficiência de extração com este composto, nem a resolução cromatográfica mais adequada.

Posto isto, optou-se por escolher a clozapina, um antipsicótico, como PI. Apesar de ser um composto comercializado em Portugal, esta escolha mostrou ser a mais adequada, visto ser um dos padrões disponíveis no laboratório, apresenta um bom comportamento cromatográfico e não interfere com os outros analitos nem com a matriz biológica utilizada. Para além disso, a sua estrutura é tricíclica como a CLP apresentando algumas propriedades químicas semelhantes como a hidrofobicidade e a basicidade e já foi utilizada como PI na determinação de antipsicóticos como demonstra o relatório da Waters [219].

De modo a garantir a ausência deste composto nas amostras de pacientes, efetuou-se um pequeno inquérito, onde se solicitaram algumas informações adicionais acerca do paciente (**ver anexos**).

Assim, para a determinação da linearidade, prepararam-se quatro curvas de calibração, uma para cada substância em estudo, com 7 pontos de concentrações que variam entre 0,1 a 5 µg/mL, por fortificação de alíquotas de 2,5 mL de urina, isentas dos analitos em estudo. A cada uma das amostras de calibração adicionou-se o PI (2,5 µg/mL)

e, adotando as metodologias otimizadas descritas na secção 4.5.1.1. e 4.5.2.1. procedeu-se à extração e análise. A gama de trabalho deve incluir o intervalo de concentrações do analito na matriz em estudo, a concentração de cada amostra deve situar-se numa zona robusta da curva de calibração e o limite inferior da gama de trabalho deve ser igual ou superior ao limite de quantificação do método [220].

As estimativas obtidas na regressão e a representação gráfica da função, só por si, não são suficientes para estabelecer a linearidade [204]. Posto isto, foram realizados alguns testes estatísticos, como o teste de Mandel ou teste de Fisher/Snedecor e a análise de resíduos, de modo a complementar a linearidade do método.

O teste de Mandel, também conhecido por teste de Fisher/Snedecor, permite a comparação de dois métodos através de modelação por mínimos quadrados – um linear e outro não linear (polinomial) – para testar a linearidade do conjunto de dados que proporciona um melhor ajuste dos pontos da curva de calibração [221, 222]. A diferença de variâncias é calculada pela **equação 2** e posteriormente o valor de teste (TV) obtido (**equação 3**) é comparado com o valor tabelado da distribuição *F* de Fisher/Snedecor ( $N-1; N-1; \alpha$ ), para um grau de confiança de 95%. Se o TV calculado for inferior ou igual ao  $F_{crítico}$  as diferenças entre as variâncias não são estatisticamente significativas, o que indica que a função polinomial não conduz a um ajustamento significativamente melhor, e por isso, a função de calibração mais adequado é a linear [222]. Por outro lado se o TV calculado ultrapassar o valor de  $F_{crítico}$  as diferenças de variâncias são estatisticamente significativas, indicando que a função de calibração é não linear e por isso a gama de trabalho deve ser reduzida tanto quanto possível de forma a cumprir a alternativa, segundo a norma ISO 8466-2 [223]. Caso não seja possível, deverá ser utilizada uma função de calibração não linear [204].

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y/x}^2 - (N - 3) \times S_{y^2}^2 \quad \text{(equação 2)}$$

Em que:

*N* representa o número de amostras de calibração;

$S_{y/x}^2$  a variância da correlação linear;

$S_{y^2}^2$  a variância da correlação não linear (quadrática).

$$TV = \frac{DS^2}{S_y^2} \quad \text{(equação 3)}$$

A análise da regressão linear e não linear foi realizada usando uma folha de cálculo Excel do Windows. Por fim, realizou-se uma análise de resíduos, a qual baseou-se na avaliação da distância entre os valores de  $y$  experimentais e os valores  $y'$  ideais da curva de calibração. Efetuou-se uma representação gráfica dos valores dos resíduos em função das concentrações para verificar a linearidade do modelo escolhido anteriormente pelo teste de Mandel. Para a existência de linearidade na gama de concentração escolhida, foi definido que os valores deviam ter um desvio igual ou inferior a 10%, ou seja, estar compreendidos entre 0 e 10%. Caso existam resíduos com um desvio superior a 10%, estes devem ser excluídos, sendo necessário reduzir a gama de concentrações e aplicar novamente o teste até que os requisitos sejam satisfeitos [224].

#### 4.6.3. Limites de Detecção e quantificação

O limite de deteção (LOD) é definido como a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detetada mas não necessariamente quantificada com um valor exato. O limite inferior de quantificação (LLOQ) define-se como a concentração mais baixa do analito, numa amostra, que pode ser determinada quantitativamente com valores de precisão e exatidão aceitáveis [203, 225]. Segundo a FDA [205] o padrão mais baixo da curva de calibração pode ser aceite como limite de quantificação se a resposta produzida pelo analito for, no mínimo, 5 vezes a resposta da linha de base obtida pela amostra branca e se o pico do analito for identificável, discreto e reprodutível com uma precisão de 20% e valores de exatidão  $\pm 20\%$ .

Ambos os limites dependem do analito, da matriz da amostra, do método escolhido para análise, das condições laboratoriais e do equipamento, assim como de toda a sequência analítica [209]. Existem vários métodos para a determinação do LOD e do LOQ [206]. Neste trabalho, o estudo destes parâmetros foi baseado no método de calibração, cuja metodologia é mais lógica e linear, sendo teoricamente obtidos os valores verdadeiros dos limites [209]. O cálculo dos limites foi, assim, efetuado com base nos dados

das curvas de calibração obtidas na linearidade para cada composto em estudo e mediante a aplicação das seguintes funções matemáticas:

$$LOD = \frac{(3,3 \times S_{y/x})}{b} \quad \text{(equação 4)}$$

$$LOQ = \frac{(10 \times S_{y/x})}{b} \quad \text{(equação 5)}$$

Onde,  $S_{y/x}$  representa o desvio padrão residual e  $b$  o declive da curva de calibração.

#### 4.6.4. Precisão

A precisão de um método analítico exprime o grau de variação (dispersão) entre uma série de medições obtidas de múltiplas amostragens da mesma amostra, sob as mesmas condições. Preferencialmente, o estudo da precisão deve recair sobre amostras, de forma a minimizar os efeitos de matriz. Este é um parâmetro que pode ser medido pela repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade [203].

A repetibilidade, também denominada de precisão intra-dia ou intra-ensaio, exprime a precisão de um método de ensaio efetuado com condições idênticas, isto é, refere-se a ensaios efetuados sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível, como por exemplo, mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo tipo de reagentes durante um período de tempo reduzido [204]. Este parâmetro foi estudado em conjunto com a precisão intermédia.

A precisão intermédia, também designada por precisão inter-dia, refere-se à precisão avaliada utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a variar, tais como: diferentes dias de análise, diferentes analistas, diferentes equipamentos. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa de variabilidade dos resultados num laboratório e, como tal, mais aconselhável para se usar [226].

Por fim, a reprodutibilidade ou precisão inter-laboratorial, obtém-se quando todos os fatores são diversificados durante a execução do método analítico, inclusive o laboratório. Neste trabalho não se efetuou o estudo da reprodutibilidade, uma vez que esta pressupõe o envolvimento de outros laboratórios para a realização dos ensaios inter-laboratoriais.

Neste trabalho, a precisão expressa pela percentagem do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV), foi avaliada através da injeção de extratos obtidos de ambas as metodologias em estudo (MEPS e QuEChERS). Estes foram preparados por fortificação de amostras brancas de urina a três níveis de concentração diferentes, nível baixo (LL), médio (ML) e alto (HL) da curva de calibração (0,1 µg/mL, 2,5 µg/mL e 5 µg/mL, respetivamente). Foram analisadas três réplicas (n = 3) no mesmo dia para obter a repetibilidade e para a avaliação da precisão intermédia, analisaram-se seis réplicas de cada nível durante cinco dias não consecutivos (n = 15).

Depois de aplicados os métodos, foram obtidas as áreas relativas para cada substância, em replicado, e calculou-se a média, desvio padrão (s), e o coeficiente de variação (CV ou RSD) (equação 6 e 7).

$$s = \frac{\sqrt{\sum x_i - (X)}}{(n - 1)} \quad \text{(equação 6)}$$

$$RSD \text{ ou } CV(\%) = \left(\frac{s}{\bar{X}}\right) \times 100 \quad \text{(equação 7)}$$

Onde,  $\bar{X}$  é a média aritmética de um pequeno número de medições;  $x_i$  o valor individual de uma medição e  $n$  o número de medições.

Posteriormente os resultados foram tratados por aplicação da ferramenta ANOVA (fator único), através da qual podem ser extraídas estimativas da repetibilidade e da precisão intermédia, de acordo com a norma ISO 5725 [220]. As expressões utilizadas encontram-se apresentadas na **Tabela 7** e na **Tabela 8**.

**Tabela 7.** Tabela ANOVA (fator único) [227, 228].

Fonte	Média Quadrática (MQ)	Graus de Liberdade (g.l.)
<i>Entre grupos</i>	$MS_{run} = \frac{n \sum_{i=1}^p (\bar{X}_i - \bar{\bar{X}})^2}{p - 1}$	$p - 1$
<i>Dentro de grupos</i>	$MS_r = \frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (X_{ij} - \bar{X}_i)^2}{p(n - 1)}$	$p(n - 1)$
<i>Total</i>		$pn - 1$

**Tabela 8.** Cálculo das estimativas das variâncias para o modelo experimental utilizado no estudo da repetibilidade e precisão intermédia [227, 228].

<b>Variância</b>	<b>Expressão</b>
<i>Variância da Repetibilidade</i> ( $S_r^2$ )	$S_r^2 = MS_r$
<i>Variância da precisão "Between-run"</i> ( $S_{run}^2$ )	$S_{run}^2 = \frac{MS_{run} - MS_r}{n}$
<i>Variância da Precisão intermédia</i> ( $S_1^2$ )	$S_1^2 = (S_r^2) + (S_{run}^2)$

Onde  $p$  é o número de sequências de análises para cada nível de concentração (uma sequência por cada dia);  $n$  é o número de replicados efetuados em cada sequência;  $X_{ij}$  representa um replicado individual (replicado  $j$ ) obtido na sequência  $i$ ;  $\bar{X}_i$  representa a média de  $n$  replicados obtidos na sequência  $i$ ;  $\bar{\bar{X}}$  é a média das médias de  $p$  sequências[227].

#### 4.6.5. Exatidão

A exatidão descreve a proximidade, ou a concordância, entre o resultado obtido na medição e o valor de referência aceite convencionalmente como verdadeiro [204]. Esta é determinada por intermédio da precisão do método, devendo-se elaborar no mínimo, cinco análises de três gamas diferentes de concentrações (baixa, média e alta) [229].

A exatidão de um método é afetada por erros sistemáticos (*Bias*) e por erros aleatórios (precisão), porém é comumente usada apenas para avaliar os erros sistemáticos. Os processos normalmente utilizados para avaliar este parâmetro são o uso de materiais de referência certificados (MRC), com a participação em comparações inter-laboratoriais e a realização de ensaios de recuperação [204]. Na ausência de MRC, a impossibilidade de ensaios inter-laboratoriais e a inexistência de um método de referência, a veracidade do método analítico pode ser avaliada através dos valores de recuperação absoluta obtidos a partir da análise de amostras fortificadas (adição de uma quantidade conhecida de analito à matriz branca) [221, 230]. Este procedimento pode ter algumas limitações, uma vez que a estimativa da recuperação obtida em amostras fortificadas pode ser distinta da que seria obtida numa amostra real [118]. No entanto,

considera-se que a fortificação de amostras líquidas pode constituir uma representação razoável dos analitos em amostras reais <sup>[231]</sup>.

A metodologia experimental utilizada para o estudo da exatidão foi a mesma que a descrita anteriormente para a precisão intermédia. A exatidão, em percentagem, pode ser expressa como o erro médio relativo da concentração estimada (EMR ou *Bias*) (**equação 8**) para cada nível de concentração ou como recuperação percentual <sup>[206]</sup>.

$$EMR \text{ ou } Bias = \frac{(Concentração \text{ calculada} - Concentração \text{ teórica})}{Concentração \text{ teórica}} \times 100 \quad (\text{equação 8})$$

Como referido anteriormente, quando se utilizam amostras fortificadas a estimativa da recuperação obtida pode apresentar diferenças em relação às amostras reais. Neste caso, os resultados analíticos devem ser corrigidos para esses erros sistemáticos, de maneira a que o valor final seja rastreável. Além disso, a incerteza dos resultados deve ser calculada como medida de confiança <sup>[227]</sup>.

Neste trabalho, estimou-se a incerteza associada à recuperação de ambas as metodologias desenvolvidas, MEPS/UHPLC-PDA e QuEChERS/UHPLC-PDA. Para tal, determinou-se a recuperação do método em percentagem ( $R_i$ ), isto é, a razão entre o valor observado ( $C_{obs}$ ) e o valor esperado ( $C_{fort}$ ) (**equação 9**) de forma a investigar a existência de erros sistemáticos, definir fatores de correção e estimar a incerteza associada à recuperação do método analítico <sup>[230]</sup>. Posteriormente, procedeu-se ao cálculo da recuperação média ( $\bar{R}$ ) segundo a **equação 10**, para cada gama de concentração.

$$R_i = \frac{C_{obs}}{C_{fort}} \quad (\text{equação 9})$$

$$\bar{R} = \frac{\sum_{i=1}^p R_i}{p} \quad (\text{equação 10})$$

Onde:

$p$  representa o número de grupos (dias);

$R_i$  é a recuperação média de  $n$  replicados obtidos em condições de repetibilidade.

Através do teste *t-Student*, calculou-se o valor de teste ( $t_{exp}$ ) pela **equação 11**, de modo a averiguar se a recuperação média em percentagem era estatisticamente diferente da unidade (que corresponde a 100%) para cada gama de concentração <sup>[230, 231]</sup>.

$$t_{exp} = \frac{|1 - \bar{R}|}{U_{\% \bar{R}}} \quad \text{(equação 11)}$$

$$U_{\% \bar{R}} = \frac{S_{obs}}{\sqrt{p}} \quad \text{(equação 12)}$$

Em que:

$U_{\% \bar{R}}$  representa a incerteza na recuperação média;

$S_{obs}$  é o desvio padrão de  $p$  valores de  $R_i$  obtidos em condições de precisão intermédia

O valor de teste obtido é comparado com o valor de  $t$  tabelado bilateral ( $t_{crit}$ ), para  $p - 1$  graus de liberdade e um intervalo de confiança de 95%.

Se  $t_{exp} \leq t_{crit}$ , então  $\bar{R}$  não é significativamente diferente de 100% [227] e  $U_{\bar{R}}$  é calculado de acordo com a **equação 13**. No entanto se  $t_{exp} > t_{crit}$ , então  $\bar{R}$  é significativamente diferente de 100%. Quando não são introduzidos fatores de correção,  $U_{\bar{R}}$  é calculado de acordo com a **equação 14**. Neste caso, a incerteza é aumentada de forma a contemplar este fator adicional de incerteza [230].

$$U_{\bar{R}} = \frac{U_{\% \bar{R}}}{\bar{R}} \quad \text{(equação 13)}$$

$$U_{\bar{R}} = \frac{\sqrt{(U_{\% \bar{R}})^2 + \left(\frac{1 - \bar{R}}{k}\right)^2}}{\bar{R}} \quad \text{(equação 14)}$$

Em que:

$k$  é o fator de cobertura, a qual será utilizada para o cálculo da incerteza expandida.

#### 4.6.6. Eficiência de Extração

A eficiência ou rendimento de extração de um analito ( $EE \%$ ), também denominada por recuperação, é a relação percentual entre a resposta obtida pelo detetor a partir de uma amostra com uma quantidade de analito, previamente extraída, e a resposta desse detetor para a mesma quantidade de analito teoricamente presente (sem extração). A recuperação indica portanto a eficácia da extração de um método analítico. A recuperação do analito não precisa de ser 100%, mas deve sim ser o mais próximo possível deste, desde que seja reprodutível e o método apresente precisão adequada [205].

O estudo da eficiência de extração foi realizado através da comparação de 2 conjuntos de amostras de urina branca em triplicado. Num dos conjuntos as amostras foram fortificadas com os analitos em estudo nas três gamas de concentração usadas na precisão, sendo posteriormente sujeitas a extração com ambas as metodologias (MEPS e QuEChERS). No segundo conjunto, as amostras de urina foram sujeitas a extração por ambos os métodos, sendo os extratos posteriormente fortificados (imediatamente antes da evaporação sob corrente de azoto) com os mesmos analitos, nas três gamas de concentração referidas anteriormente. O PI foi adicionado aos dois conjuntos de amostras, após a extração e imediatamente antes da fase de secagem. Os valores da recuperação de cada analito foram calculados utilizando a **equação 15**.

$$EE (\%) = \frac{\text{Área A}}{\text{Área B}} \times 100 \quad \text{(equação 15)}$$

Onde, a *Área A* corresponde à área relativa (área analito/área PI) obtida com extração e a *Área B* corresponde à área relativa (área analito/área PI) do pico do analito obtida sem extração.

Este parâmetro permite, inclusivamente, investigar a existência de erros sistemáticos, definir fatores de correção e, se relevante, estimar a incerteza associada à recuperação do método como dado de entrada do procedimento do cálculo de incertezas [209]. Neste trabalho não foi investigada esta parte estatística da recuperação, uma vez que a avaliação deste parâmetro foi previamente calculada aquando a otimização das técnicas de extração.

#### 4.6.7. Efeito de matriz

O efeito de matriz é um parâmetro igualmente importante na validação de um método analítico, pois é uma das principais causas de erros em análises bioanalíticas [232]. Este pode ser definido como qualquer alteração no processo de ionização de um analito devido a um composto coeluído. Essa alteração pode resultar num aumento ou numa supressão iónica afetando a precisão, a sensibilidade e a exatidão de um procedimento analítico [233].

Dado que o efeito de matriz se encontra relacionado com a alteração da ionização de um composto, este parâmetro torna-se mais pertinente quando o método analítico envolve espectrometria de massa. Por esta razão, no presente trabalho, o efeito de matriz não foi avaliado, uma vez que o PDA não interfere na ionização dos analitos da amostra.

# CAPÍTULO V

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**



## CAPÍTULO V - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao longo deste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos no trabalho experimental efetuado, nomeadamente os resultados da otimização das condições cromatográficas, assim como da otimização e validação de ambas as técnicas de extração utilizadas (MEPS e QuEChERS) e os resultados obtidos da aplicação a casos reais.

### 5.1. Otimização das Condições Cromatográficas

Antes da otimização das metodologias analíticas de extração, foi necessário otimizar algumas condições do sistema analítico escolhido para este trabalho.

As análises cromatográficas foram efetuadas num sistema analítico UHPLC-PDA, utilizando uma coluna analítica de fase reversa Acquity UPLC® HSS T3 existente no laboratório. Esta é constituída por partículas de sílica de alta resistência (HSS) de tamanho 1,8 µm (100 mm × 2,1 mm) e uma pré-coluna VanGuard™ 1,8 µm (5 mm × 2,1 mm). Esta coluna apresenta uma fase ligada de alquilo trifuncional (T3) inovadora, que promove a separação de compostos orgânicos polares via fase reversa e é compatível com fases móveis aquosas [234]. Esta coluna mostrou ser adequada para a realização do estudo das condições ótimas para a deteção e identificação da FLX, NORFLX, CLP e DESCLP.

Para a otimização da fase móvel, diferentes solventes foram testados, nomeadamente, acetonitrilo, metanol e ácido fórmico (0,1%), em modo gradiente e em modo isocrático. Para tal, injetou-se uma solução padrão com todos os ADs em estudo, incluindo o PI, a uma concentração de 10 µg/mL.

Na **Tabela 9** estão descritos os diferentes testes efetuados para a otimização da fase móvel.

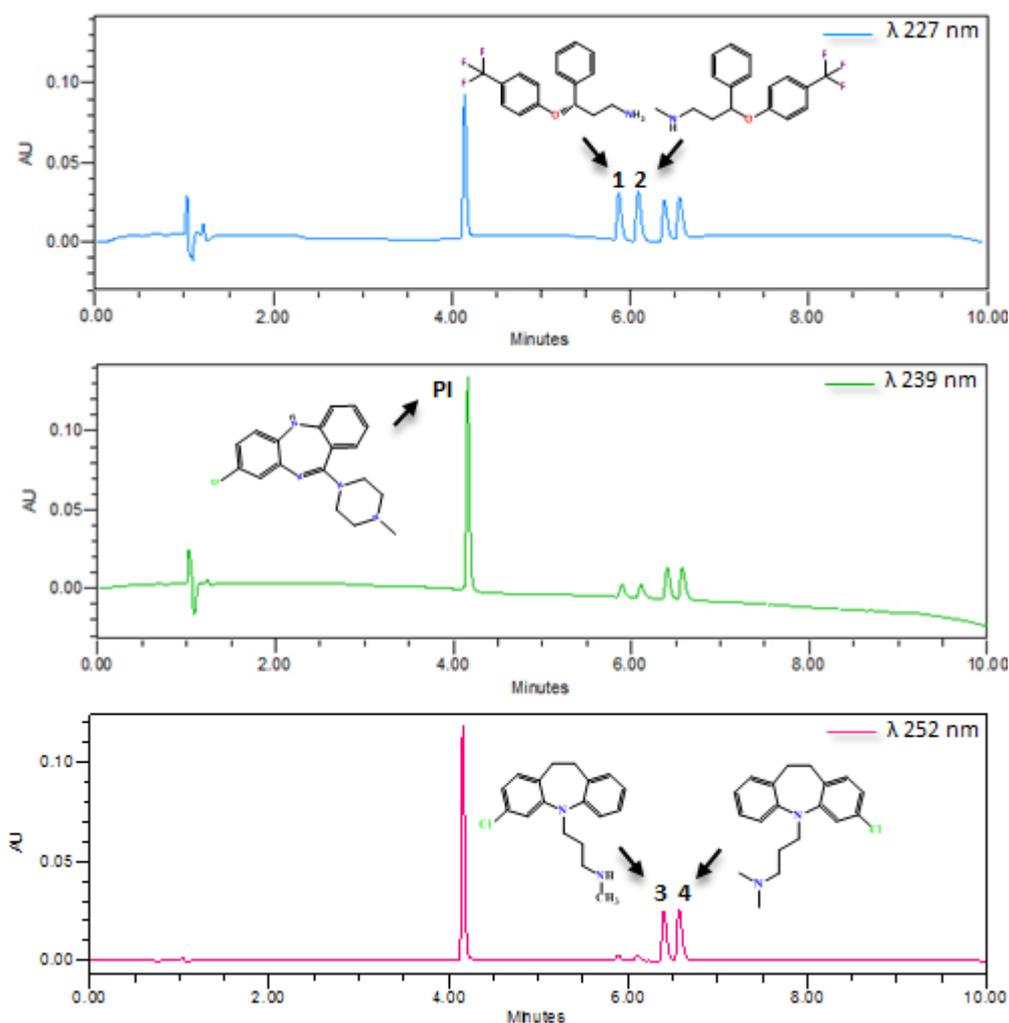
**Tabela 9.** Condições testadas para a otimização da fase móvel para análise dos ADs em estudo por UHPLC-PDA.

Condições testadas					
	Fluxo (min/mL)	Tempo de corrida (min)	Solvente A H <sub>2</sub> O 0,1% FA (%)	Solvente B MeOH (%)	Solvente C ACN (%)
<b>Isocrático 1</b>	0,250	10	30	70	-
<b>Isocrático 2</b>	0,250	10	60	-	40
<b>Isocrático 3</b>	0,250	10	50	15	35
<b>Gradiente 1</b>	0,200	0	75	25	0
		2	60	30	10
		3	65	0	35
		5	50	0	50
		9	30	0	70
		10	75	25	0
<b>Gradiente 2</b>	0,200	0	85	-	15
		8	45	-	55
		9	30	-	70
		10	85	-	15
<b>Gradiente 3</b>	0,250	0	90	-	10
		0,5	90	-	10
		1,5	65	-	35
		3	60	-	40
		5	50	-	50
		7	40	-	60
		8	30	-	70
		10	90	-	10
<b>Gradiente 4</b>	0,500	0	90	-	10
		0,5	90	-	10
		1,5	65	-	35
		3	60	-	40
		5	50	-	50
		7	40	-	60
		8	30	-	70
		10	90	-	10

Após análise cromatográfica das condições anteriormente testadas, optou-se por escolher a fase móvel em modo gradiente 3, constituída por uma solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% e acetonitrilo, com um fluxo constante de 0,250 mL/min, visto apresentar a melhor separação dos ADs e do PI entre os gradientes e modo isocrático testados. Verificou-se que a utilização do metanol na fase móvel não permitia uma boa separação dos analitos, assim como o modo isocrático também não forneceu bons resultados cromatográficos.

O volume de injeção estabelecido foi de 2 µL, com um fluxo constante de 0,250 mL/min, durante um tempo de corrida de 10 minutos. Para a seleção do comprimento de

onda de absorção, analisou-se uma solução padrão de cada antidepressivo, utilizando o PDA, o qual forneceu um espectro de absorção através de um varrimento entre 200 a 400 nm. Na **Figura 21** encontram-se apresentados os cromatogramas com os comprimentos de onda máximo de cada antidepressivo, incluindo o do PI.



**Figura 21.** Cromatograma obtido com as melhores condições cromatográficas nos comprimentos de onda máximo de cada analito. (1-NORFLX; 2-FLX; 3-DESCLP; 4-CLP; PI-clozapina).

Os solventes utilizados nas diversas fases móveis testadas foram filtrados a vácuo através de um sistema de filtração All-Glass da Millipore. As temperaturas da coluna e do compartimento das amostras foram estabelecidas a 30°C e 20°C respetivamente.

Importa referir que para reduzir o “efeito de memória” (carry-over) na coluna cromatográfica, foi injetado acetonitrilo entre cada injeção de amostra.

## 5.2. Otimização do Procedimento de Extração por MEPS

Com o objetivo de maximizar a eficiência de extração da MEPS, parâmetros como a seleção do sorvente, o pH da amostra, o volume de amostra e número de ciclos de extração, as condições de lavagem e de eluição, foram otimizados usando um *design* experimental univariado, para estabelecer o equilíbrio de partição dos analitos em tempos mais curtos de análise e obter a sensibilidade adequada para a análise destes por UHPLC-PDA.

Para a otimização do procedimento MEPS, partiu-se de um procedimento base tendo em conta os trabalhos de Mandrioli *et al.* (2011)<sup>[235]</sup>, de Chaves *et al.* (2010)<sup>[151]</sup> e de Mercolini *et al.* (2014)<sup>[236]</sup>. As condições experimentais inicialmente utilizadas encontram-se descritas na **Tabela 10**.

**Tabela 10.** Condições experimentais iniciais do procedimento MEPS.

Etapas da MEPS	Condições Experimentais
<i>Condicionamento</i>	250 µL de MeOH + 250 µL de H <sub>2</sub> O (0,1% FA).
<i>Passagem da amostra</i>	5 × 250 µL de urina fortificada
<i>Lavagem</i>	1 × 100 µL H <sub>2</sub> O (0,1% FA)
<i>Eluição</i>	1 × 250 µL de MeOH

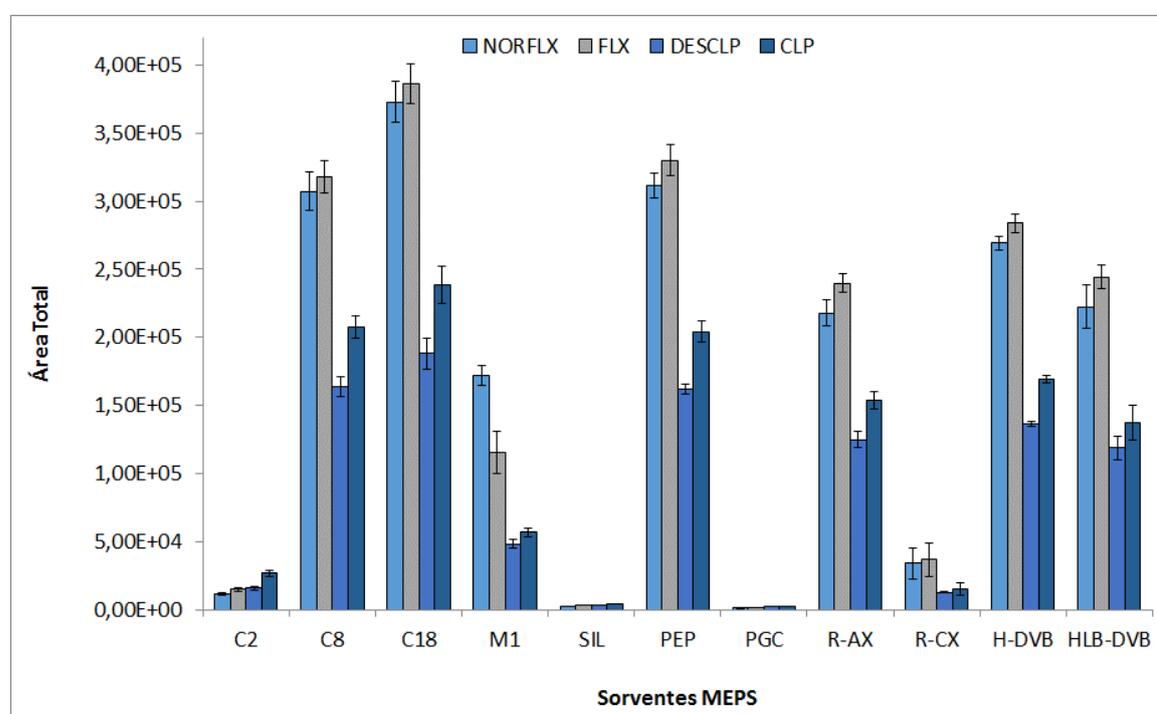
Após a extração, uma alíquota de 2 µL foi injetada no sistema cromatográfico UHPLC-PDA. De modo a prolongar o tempo de vida do sorvente, procedeu-se a uma lavagem com 250 µL de metanol, seguido de 250 µL H<sub>2</sub>O (0,1% FA). Este passo adicional permite que o “efeito de memória” (carry-over) seja reduzido e que o sorvente seja condicionado para a próxima extração.

As amostras brancas de urina utilizadas no processo de otimização foram provenientes de voluntários do CQM não consumidores de ADs. Todo o processo de otimização foi realizado em triplicado, utilizando amostras de urina fortificadas com os padrões dos ADs, a uma concentração de 10 µg/mL. Todos os ensaios foram efetuados com recurso a uma seringa analítica automática eVol® XR. As condições ótimas foram

selecionadas pela totalidade das áreas dos picos de cada analito, obtidas em cada parâmetro.

### 5.2.1. Natureza do sorvente

A escolha do sorvente adequado na MEPS é um fator importante, uma vez que está diretamente relacionado com a natureza química do analito de interesse e da matriz na qual ele se encontra. Posto isto, onze fases sólidas foram avaliadas, nomeadamente, C<sub>2</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>, SIL, R-AX, R-CX, PGC, HLB-DVB, H-DVB, PEP e M<sub>1</sub>. Na **Figura 22** encontra-se apresentada a resposta do UHPLC-PDA para os analitos em estudo em função dos diferentes sorventes estudados.



**Figura 22.** Comparação da eficiência de extração dos diferentes sorventes MEPS para cada antidepressivo.

A performance de cada sorvente MEPS foi avaliada em termos de intensidade da resposta observada (área do pico) e reprodutibilidade. Entre os sorventes analisados, observou-se que o C<sub>18</sub> permitiu a melhor eficiência de extração da FLX, da CLP e dos seus metabolitos, uma vez que forneceu maior resposta em termos de áreas, tendo sido selecionado para os ensaios seguintes. Por outro lado o sorvente PGC apresentou a resposta mais baixa.

Tal como referido na **Tabela 4**, os sorventes C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub> são mais adequados para analitos apolares, enquanto as fases poliméricas, tais como DVB ou fases de modo misto (resinas de troca iónica) são mais adequadas para analitos polares, tais como compostos ácidos e básicos. O facto dos analitos em estudo serem muito apolares, permitiu uma grande afinidade para com o sorvente de sílica funcionalizada com um grupo octadecil, através de interações de *van der Waals* ou de dispersão. Os analitos ficam fortemente retidos devido a forças atrativas entre ligações carbono-hidrogénio nas moléculas dos analitos e grupos funcionais apolares da superfície do sorvente <sup>[119]</sup>. O PGC por outro lado é um sorvente que proporciona uma forte retenção de compostos muito polares através do seu mecanismo de retenção que envolve uma interação de carga induzida do analito polar com a sua superfície polarizada <sup>[237]</sup>. Contudo, dada a polaridade dos analitos em estudo, este sorvente não apresenta grande afinidade para com estes, o que justifica os maus resultados obtidos.

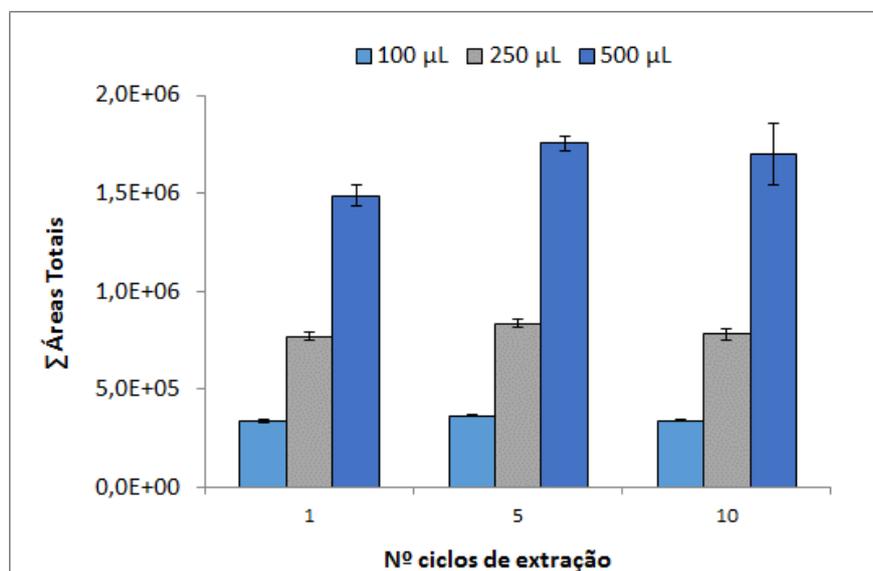
Após a escolha do melhor sorvente, passou-se à otimização do número de ciclos de extração e volume de amostra.

### 5.2.2. Influência do número de ciclos de extração e volume de amostra

O número de ciclos de extração é um parâmetro importante, uma vez que influencia a retenção dos analitos na fase sólida do sorvente <sup>[143]</sup>. A amostra sobe e desce pela agulha da seringa uma ou mais vezes (ciclos) podendo ser extraída e descartada no mesmo vial ou ser extraída e descartada para os resíduos <sup>[142]</sup>. A primeira opção foi a selecionada para este estudo. Genericamente, os procedimentos MEPS usam um ou mais ciclos de extração, proporcionando uma oportunidade de otimização. Quando a amostra passa diversas vezes pelo sorvente a interação dos analitos com a fase sólida é maior, possibilitando uma maior eficiência de extração <sup>[142]</sup>.

Visto a MEPS ser uma técnica que visa a diminuição do volume de amostra utilizado, é igualmente necessário otimizar este parâmetro. Neste sentido, o número de ciclos de extração e volume de amostra foram otimizados testando 1, 5 e 10 ciclos em alíquotas de 100, 250 e 500 µL de urina fortificada. A influência do número de ciclos de extração e volume de amostra sobre a performance da MEPS encontra-se ilustrado na **Figura 23**.

A velocidade do fluxo durante a aspiração, é igualmente importante, pois previne a cavitação e aumenta o tempo de interação do analito com o sorvente, aumentando, assim, a eficiência de extração. Deste modo a velocidade do fluxo foi limitada a 20  $\mu\text{L/s}$ .



**Figura 23.** Influência do número de ciclos de extração e volume de amostra.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que a competição pelos sítios ativos de adsorção do sorvente  $\text{C}_{18}$  aumenta com o nº de ciclos. Por outro lado, uma matriz complexa como a urina, pode saturar a fase estacionária e impedir o acesso dos analitos para os sítios de adsorção já bloqueados por interferências. Por esta razão, 5 ciclos de extração foram selecionados devido à boa eficiência e a possibilidade de prolongar o tempo de vida do sorvente.

Relativamente ao volume de amostra, verifica-se um aumento gradual das áreas conforme aumenta o volume de amostra. É possível observar algumas diferenças quando passamos 500  $\mu\text{L}$  de amostra 1 $\times$ , 5 $\times$  e 10 $\times$  pelo sorvente, verificando-se um aumento significativo das barras de erro quando passamos 10 vezes 500  $\mu\text{L}$ . Posto isto, os resultados mostram que um volume de 500  $\mu\text{L}$  e 5 ciclos são suficientes para se obter uma boa eficiência de extração.

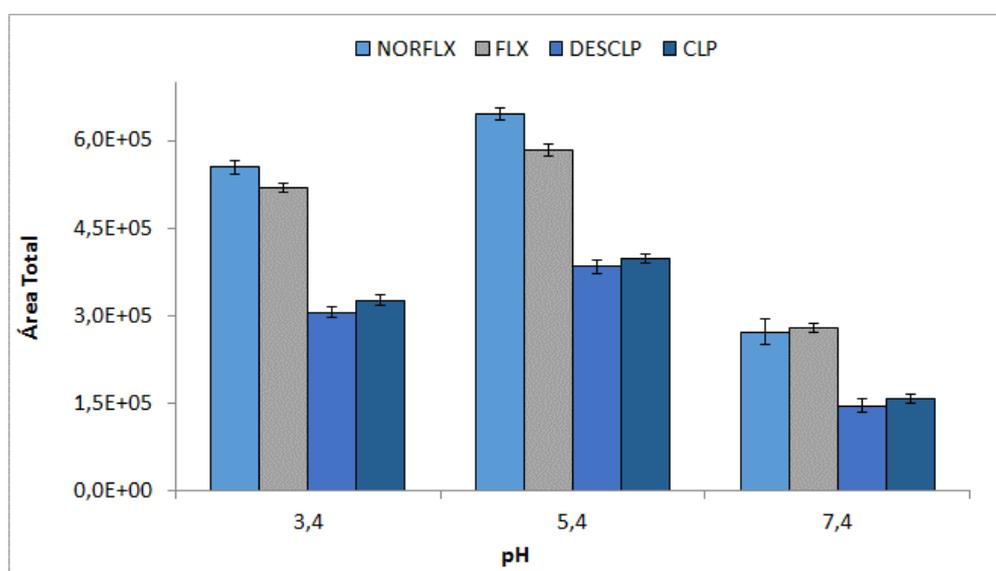
### 5.2.3. Influência do pH da amostra

A influência do pH da matriz na eficiência do processo de extração é um parâmetro muito importante, visto que os fármacos estudados apresentam grupos ionizáveis. Tendo

em conta os valores de pKa dos compostos estudados (ver **Tabela 1** e **Tabela 2**) e a gama de pH suportada pelo sorvente (2 - 8), o intervalo de pH selecionado para este estudo variou entre 3,4 e 7,4 (pH ajustado com HCl 0,1M e NaOH 0,5M).

Valores de pH abaixo de 2, as ligações  $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$  que formam o “esqueleto” da sílica e são responsáveis por manter os grupos orgânicos imobilizados na superfície desta, ficam mais suscetíveis à hidrólise. Ao passo que, valores de pH acima de 8, os grupos hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) reagem facilmente com os silanóis residuais, promovendo a dissolução da sílica [238]. Como consequência, a fase estacionária dentro da coluna é alterada, resultando em eficiências baixas e um alargamento frontal do pico [239].

Os resultados obtidos encontram-se representados na **Figura 24**.



**Figura 24.** Estudo do efeito do pH na eficiência de extração da MEPS.

De acordo com os valores de pka dos analitos em estudo (9,2 – 10,0), seria de esperar que para valores de pH mais elevados (meio mais básico), a eficiência de extração fosse a que tivesse melhores resultados, uma vez que as moléculas vão estar menos ionizáveis, facilitando as interações hidrofóbicas. No entanto, podemos observar no gráfico anterior que existem algumas diferenças entre os valores de pH estudados, sendo o pH 5,4 o que apresenta a melhor adsorção de todos os analitos. Uma possível justificação é que nesta condição as moléculas estão mais ionizadas e irão interagir com os grupos silanol da fase estacionária. Além disso, a presença dos grupos halogenados flúor e cloro na estrutura da FLX e CLP, respetivamente, pode modelar o pka das

moléculas, isto é, o facto de serem extremamente eletronegativos pode condicionar a distribuição de cargas na molécula e, portanto, o equilíbrio ácido-base desta <sup>[240]</sup>. No caso do pH 3,4 uma possível explicação é que com o aumento da ionização há um aumento das cargas positivas em solução podendo causar uma maior repulsão entre os analitos dificultando assim a retenção destes.

O pH 5,4 foi, assim, o valor de pH selecionado para os ensaios que se seguiram, visto ter sido o que obteve melhores resultados e o facto de estar dentro da gama do pH fisiológico das amostras de urina (5-7)<sup>[241]</sup>.

#### 5.2.4. Influência da lavagem

A etapa de lavagem após a passagem da amostra é fundamental para eliminar compostos provenientes da matriz, que podem interferir no método analítico, assim como levar à saturação da resina.

A seleção das melhores condições de lavagem do sorvente é um fator crítico no processo de extração, uma vez que o analito não pode ser eluído em conjunto com os interferentes devendo permanecer retido na fase sólida. Geralmente, esta etapa é realizada com o mesmo solvente usado para equilibrar o sorvente no primeiro passo da extração, nomeadamente água contendo 0,1 % de ácido fórmico. De modo a obter as melhores condições de lavagem, efetuaram-se vários testes de lavagem que se encontram descritos na tabela seguinte:

**Tabela 11.** Condições experimentais testadas no processo de lavagem da MEPS.

Teste de lavagem	Condições Experimentais
1	1 × 100 µL H <sub>2</sub> O (0,1% FA)
2	1 × 100 µL H <sub>2</sub> O (0,1% FA):MeOH (95:5, v/v)
3	1 × 100 µL H <sub>2</sub> O (0,1% FA) + 1 × 100 µL ACN:H <sub>2</sub> O (0,1% FA) (10:90, v/v)
4	1 × 100 µL H <sub>2</sub> O (0,1% FA) + 1 × 100 µL MeOH:H <sub>2</sub> O (0,1% FA) (10:90, v/v)
5	1 × 100 µL ACN:H <sub>2</sub> O (0,1% FA) (10:90, v/v)
6	1 × 100 µL H <sub>2</sub> O (0,1% FA) + 1 × 100 µL MeOH:H <sub>2</sub> O (0,1% FA) (30:70, v/v)

Para além do extrato obtido no passo da eluição, analisaram-se também os extratos de cada teste de lavagem, de modo a verificar se os analitos em estudo eram

eluídos juntamente com os interferentes. Após a análise cromatográfica verificou-se que o teste de lavagem 4 obtinha as melhores condições, para além de remover grande parte dos interferentes, os analitos continuavam retidos no sorvente. Assim sendo, a lavagem passou a ser realizada passando 100 µL de água contendo 0,1% de ácido fórmico, seguida de 100 µL de uma solução de 10% de metanol com 90% de água acidificada.

### 5.2.5. Efeito do solvente e do volume de eluição

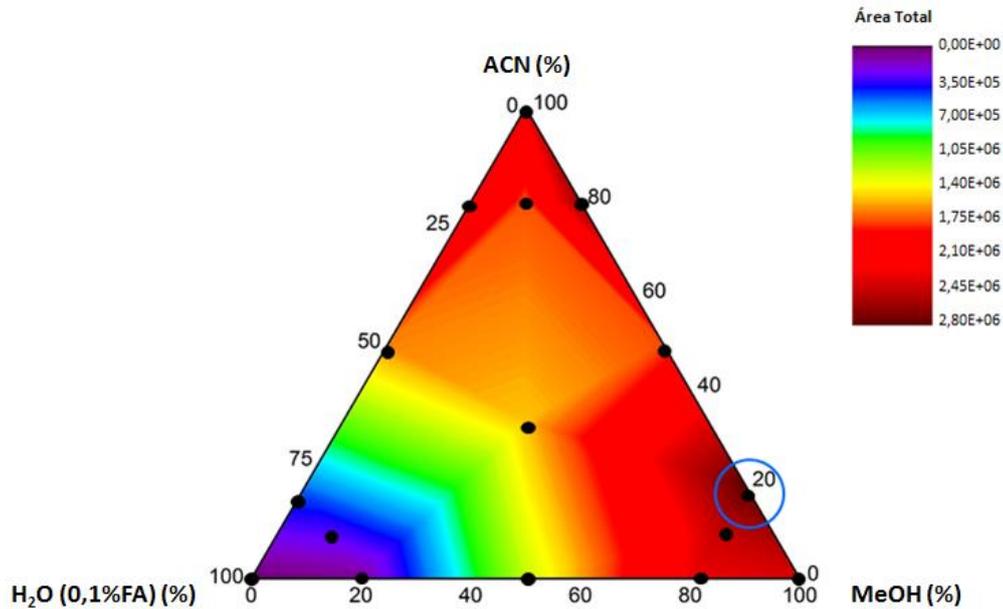
Por fim, é igualmente importante a escolha do solvente de no processo extrativo, uma vez que está diretamente relacionado com a polaridade dos analitos e do sorvente [130]. Um bom solvente de eluição deve ultrapassar as interações primárias e eventualmente secundárias no qual o analito possa estar sujeito. É recomendado que o eluente seja puro e tenha elevada percentagem de solvente ( $\geq 60\%$ ), podendo ser misturado com soluções ácidas ou básicas (0,1-3%). Além disso deve eluir o analito usando o menor volume possível [142]. Assim sendo, diferentes solventes foram testados, nomeadamente, água contendo 0,1 % de ácido fórmico, metanol, acetonitrilo, e diversas combinações entre estes, foram investigadas (ver **Tabela 12**).

**Tabela 12.** Eluentes testados no passo da eluição da MEPS.

Eluentes e Combinações Testadas	
100% MeOH	ACN:MeOH (80:20, v/v)
100% ACN	ACN:H <sub>2</sub> O (80:20, v/v)
100% H <sub>2</sub> O 0,1% FA	H <sub>2</sub> O:ACN (80:20, v/v)
MeOH:ACN (50:50, v/v)	H <sub>2</sub> O:MeOH (80:20, v/v)
ACN:H <sub>2</sub> O (50:50, v/v)	MeOH:H <sub>2</sub> O (80:20, v/v)
MeOH:H <sub>2</sub> O (50:50, v/v)	MeOH:ACN:H <sub>2</sub> O (80:10:10, v/v/v)
MeOH:ACN:H <sub>2</sub> O (33:33:33, v/v/v)	ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O (80:10:10, v/v/v)
MeOH:ACN (80:20, v/v)	H <sub>2</sub> O:ACN:MeOH (80:10:10, v/v/v)

Abreviatura: ACN – acetonitrilo; H<sub>2</sub>O 0,1% FA – água contendo 0,1% de ácido fórmico; MeOH – metanol.

Na **Figura 25** encontra-se ilustrado um gráfico ternário do sistema de solventes de eluição testados assim como das combinações realizadas.



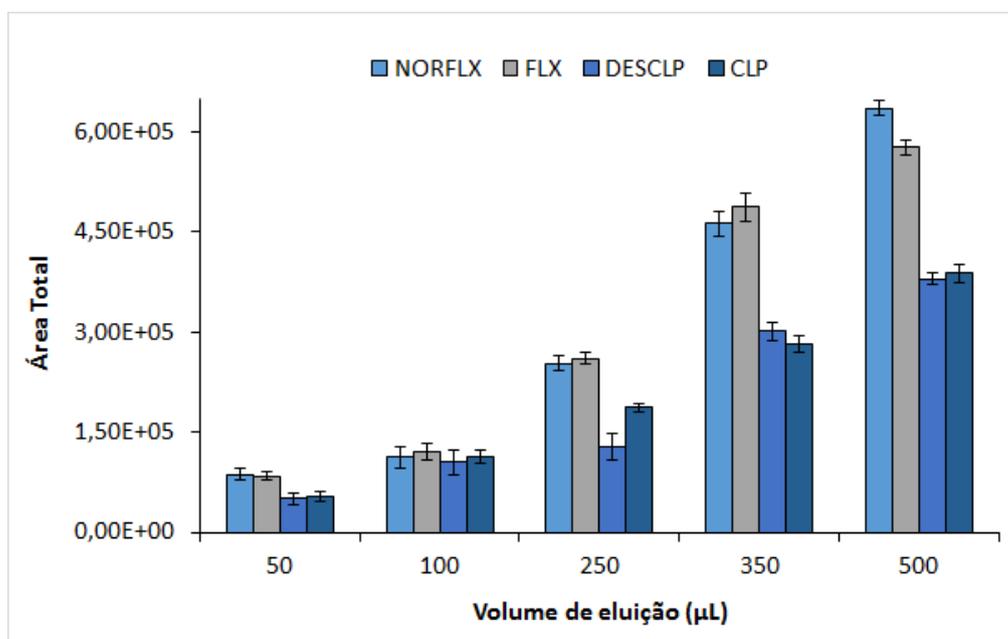
**Figura 25.** Gráfico ternário do sistema de solventes de eluição (evidenciado pela marcação a azul) obtido pelo *software* OriginLab® 9.0.

Cada ponto preto do gráfico corresponde a uma composição diferente dos três solventes testados. Nos vértices estão cada um dos solventes, sendo que cada vértice representa a concentração pura do mesmo (100 %) e zero para os outros dois solventes. A percentagem de cada eluente vai diminuindo, linearmente, com o aumento da distância a partir do vértice. Os valores do lado direito superior indicam a área total obtida para todos os ADs.

Os resultados indicam que a melhor eficiência de extração foi obtida usando a solução de 80% de metanol e 20% de acetonitrilo como solvente de eluição. Esta combinação de dois solventes orgânicos na MEPS parece permitir que as ligações hidrofóbicas entre os analitos e o sorvente sejam mais facilmente interrompidas. Além disso, o acetonitrilo é o solvente utilizado no sistema de gradiente da fase móvel. Por outro lado, a menor eficiência de extração foi obtida usando água contendo 0,1% de ácido fórmico como solvente de eluição, o que indica que solventes aquosos não possuem tanta afinidade para com os analitos para os eluir da fase estacionária. Posto isto, a solução MeOH:ACN (80:20, v/v) foi a selecionada como solvente de eluição.

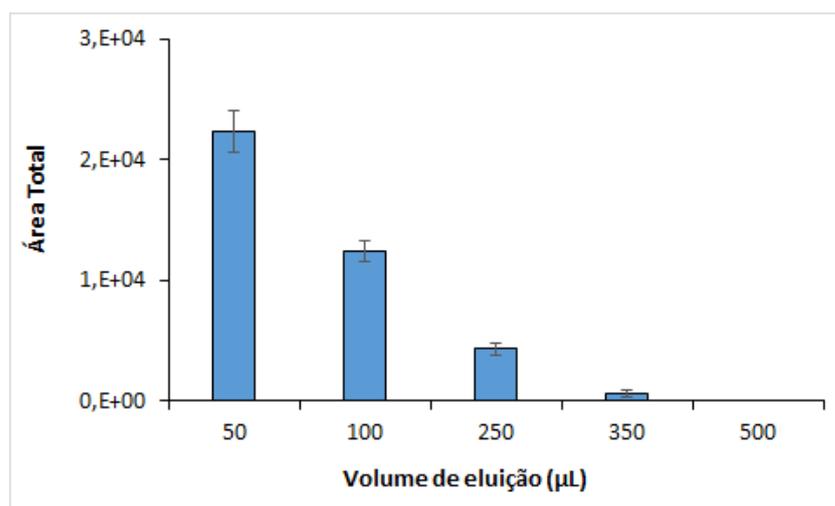
Seguidamente, diferentes volumes de eluição (50, 100, 250, 350 e 500  $\mu\text{L}$ ) também foram testados. É de salientar que após a eluição o solvente foi evaporado até à secura sob corrente de azoto e o resíduo foi redissolvido com 100  $\mu\text{L}$  de fase móvel de entrada.

A **Figura 26** apresenta os resultados obtidos de cada volume de eluição avaliado.



**Figura 26.** Influência do volume de eluição na performance da MEPS.

De acordo com os resultados, verificámos que há um aumento na eficiência de extração à medida que o volume de eluição aumenta, sendo o volume de 500  $\mu\text{L}$  o que maior área apresenta para todos os analitos. Além disso, constatámos que para os volumes de eluição mais baixos, os analitos eram eluídos na etapa do acondicionamento da MEPS, através da injeção do extrato obtido nesse passo, como podemos ver na **Figura 27**.



**Figura 27.** Somatório das áreas de todos os analitos obtidas da injeção do extrato da etapa do acondicionamento após a eluição.

Com o aumento do volume de eluição, os analitos vão sendo melhor desorvidos da fase estacionária, verificando-se uma diminuição das áreas no acondicionamento. Verifica-se, ainda, que o volume de eluição de 500 µL obtém a maior recuperação dos analitos visto não surgirem no extrato do acondicionamento. Posto isto, e tendo em conta os resultados obtidos, a etapa de eluição passou a ser realizada com 2 × 500 µL de MeOH:ACN (80:20, v/v).

Na **Tabela 13** encontram-se apresentadas as condições otimizadas da MEPS.

**Tabela 13.** Condições experimentais otimizadas da MEPS.

<b>Etapas da MEPS</b>	<b>Condições experimentais otimizadas</b>
<i>Condicionamento</i>	250 µL de MeOH: ACN (80:20, v/v) +
<i>Passagem da amostra</i>	250 µL de H <sub>2</sub> O (0,1% FA) 5 × 500 µL de urina fortificada
<i>Lavagem</i>	1 × 100 µL H <sub>2</sub> O (0,1% FA) +
<i>Eluição</i>	1 × 100 µL MeOH:H <sub>2</sub> O (0,1% FA) (10:90, v/v) 2 × 500 µL de MeOH: ACN (80:20, v/v)

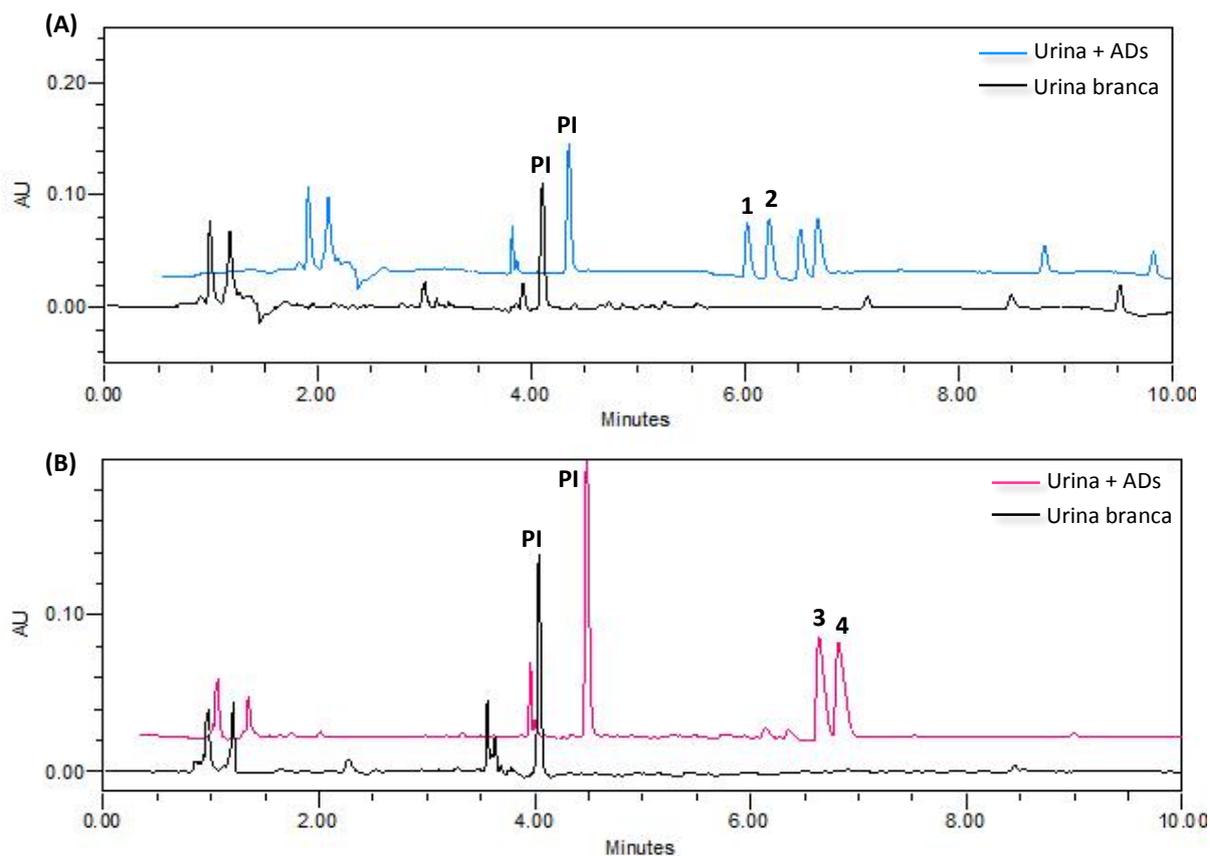
## 5.2. Validação do método analítico para a análise de antidepressivos por MEPS/UHPLC-PDA

### 5.2.1. Seletividade

A seletividade do método MEPS foi definida através da avaliação da pureza na zona dos picos cromatográficos obtidos, considerando a forma do pico, o tempo de retenção e o espectro de absorção UV, a fim de detetar possíveis interferências. As substâncias foram identificadas comparando os tempos de retenção (RT) e o comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) de cada uma delas, determinados previamente por injeção de soluções de padrões individuais de cada um dos analitos. Na **Tabela 14** estão resumidos os resultados do estudo dos ADs e do PI. Na **Figura 28 (A)** e **(B)** estão apresentados os cromatogramas obtidos e respetivos espectros de absorção UV de cada uma das substâncias.

**Tabela 14.** Tempos de retenção e comprimentos de onda máximo dos ADs em estudo e do PI.

Analito	RT (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
NORFLX	5,760	227
FLX	6,017	227
DESCLP	6,332	252
CLP	6,442	252
PI	4,004	239



**Figura 28.** Comparação dos cromatogramas de amostra de urina branca com os cromatogramas de urina fortificada com os analitos em estudo a diferentes comprimentos de onda após extração por MEPS ( $C = 2,5 \mu\text{g/mL}$ ); **(A)** 227 nm e **(B)** 252 nm. **(1 – NORFLX; 2 – FLX; 3 – DESCLP; 4 – CLP; PI – padrão interno – clozapina).**

Através da comparação dos cromatogramas da amostra de urina branca com os da amostra de urina fortificada com os analitos, verifica-se que não há quaisquer interferências de constituintes da matriz nos tempos de retenção e comprimento de onda máximo de cada uma das substâncias em estudo, permitindo concluir que o método é seletivo.

### 5.2.2. Linearidade

A linearidade do método MEPS/UHPLC-PDA foi estudada através da construção de quatro curvas de calibração (uma para cada substância), com 7 pontos de concentrações que variaram entre 0,1 a 5  $\mu\text{g/mL}$ , em triplicado. Cada curva de calibração foi construída graficamente pela relação entre a razão das áreas (área do analito/área do PI) com as concentrações do analito através da aplicação da ferramenta ANOVA (**Figura 29**).

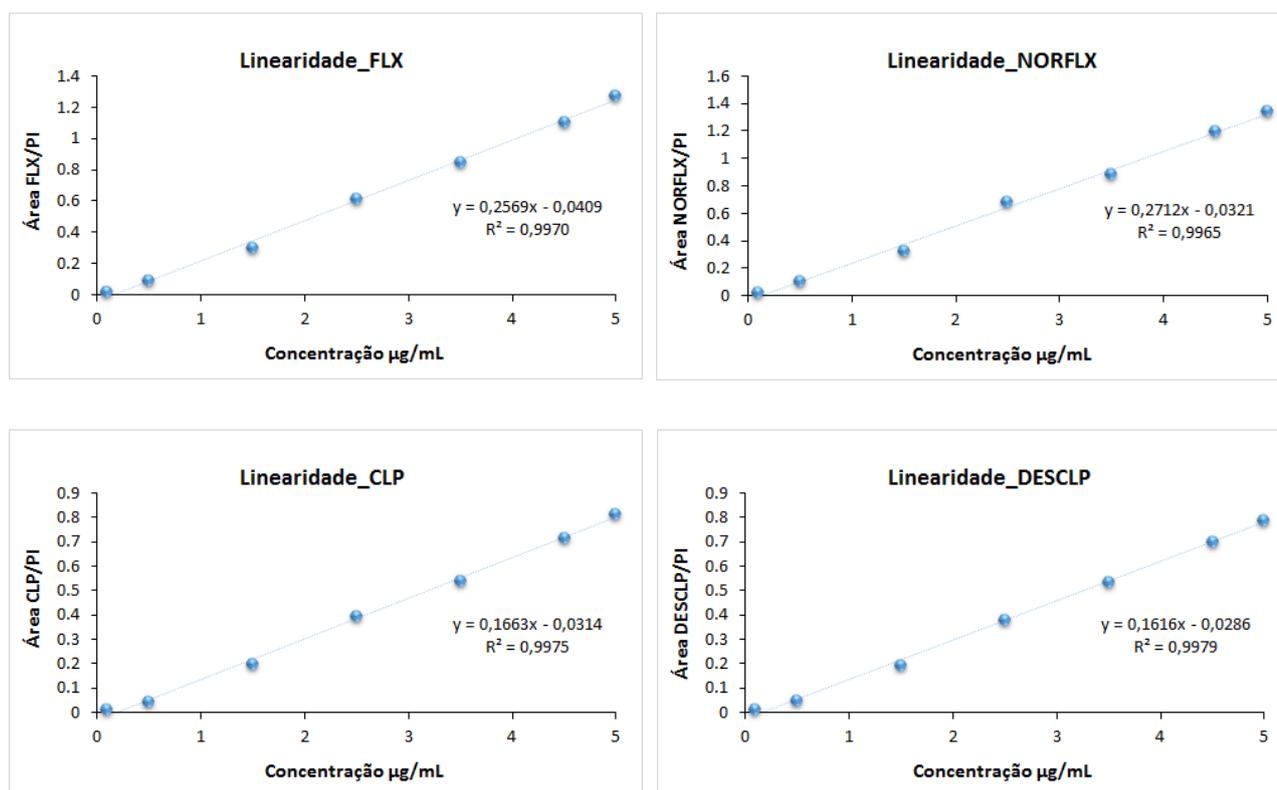


Figura 29. Curvas de calibração obtidas para cada antidepressivo.

Os resultados deste estudo apresentam-se sumariados na **Tabela 15** e os estudos estatísticos de regressão encontram-se resumidos em **anexo**. A análise da regressão linear com o método dos mínimos quadrados evidenciou valores de  $R$  e  $R^2$  superiores a 0,99 para todos os compostos em estudo e o intervalo de intercepção da ordenada na origem não é estatisticamente diferente do ponto zero. Na avaliação da distribuição dos resíduos ao longo dos valores de concentração, não foram observadas tendências, ou seja, todos os resíduos apresentaram um desvio inferior a 10%.

**Tabela 15.** Resumo dos resultados obtidos relativos ao modelo de regressão linear para os ADs em estudo por MEPS/UHPLC-PDA.

Antidepressivo	Equação da reta	R <sup>2</sup>	S <sub>y/x</sub>	Intervalo de 95% de confiança da ordenada na origem	
				Limite inferior	Limite superior
FLX	$y = 0,2569x - 0,0409$	0,9970	0,0294	-0,0905	0,0086
NORFLX	$y = 0,2712x - 0,0321$	0,9965	0,0337	-0,0889	0,0247
CLP	$y = 0,1663x - 0,0314$	0,9975	0,0176	-0,0611	-0,0018
DESCLP	$y = 0,1616x - 0,0286$	0,9979	0,0156	-0,0550	-0,0023

Como referido anteriormente, as estimativas obtidas na regressão e a representação gráfica da função, só por si, não são suficientes para estabelecer a linearidade. Como tal, esta foi ainda avaliada mediante a utilização de um teste estatístico, utilizando dois modelos de regressão: linear e não linear (polinomial). Através do teste de Mandel, foi possível avaliar qual dos modelos proporcionava o melhor ajustamento aos pontos de calibração. Calculou-se a função de calibração linear e não linear, os desvios-padrão respetivos ( $S_{y/x}$  e  $S_{y^2}$ ) e a diferença de variâncias ( $DS^2$ ). Na **Tabela 16** encontram-se os valores do teste de Mandel ( $TV$ ) calculados segundo a **equação 3** e os valores tabelados da distribuição  $F$  de Snedecor ( $N-1;N-1;0,95$ ) ( $F_{crit}$ ).

**Tabela 16.** Resumo dos resultados obtidos no teste de Mandel para os ADs em estudo por MEPS/UHPLC-PDA.

Antidepressivo	Teste de Mandel ( $TV$ )	Critério de decisão $TV \leq F_{crit} (0,95;1;N-3)$
FLX	2,48	$TV \leq 7,71 F (0,95;1;4)$
NORFLX	1,06	
CLP	1,56	
DESCLP	2,79	

De acordo com os critérios previamente estabelecidos, como os valores de  $TV$  foram inferiores aos de  $F_{crit} (0,95;1;N-3)$  para todos os ADs, os resultados obtidos mostram que, na gama de trabalho escolhida, o modelo linear é o que melhor se ajusta aos pontos da curva de calibração obtidos.

### 5.2.3. Limites de Detecção e Quantificação

Como referido anteriormente, existem vários métodos para a determinação do LOD e do LOQ. Neste trabalho, estes dois parâmetros foram estudados utilizando o método de calibração. O cálculo dos limites foi efetuado utilizando as **equações 4 e 5**, tendo como base os dados das curvas de calibração obtidas na linearidade para cada composto em estudo. Os valores do LOD e LOQ calculados encontram-se na **Tabela 17**.

**Tabela 17.** Valores de LOD e LOQ calculados para cada antidepressivo em estudo por MEPS/UHPLC-PDA.

Antidepressivo	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
FLX	0,080	0,244
NORFLX	0,087	0,265
CLP	0,074	0,225
DESCLP	0,068	0,206

Verificou-se que os valores de LOQ obtidos para todos os ADs foram superiores ao primeiro ponto da curva de calibração (0,1  $\mu\text{g/mL}$ ). Como referido na secção 4.6.3. segundo a FDA <sup>[205]</sup> o padrão mais baixo da curva de calibração pode ser aceite como limite de quantificação se a resposta produzida pelo analito for, no mínimo, 5 vezes a resposta da linha de base obtida pela amostra branca e se o pico do analito for identificável, discreto e reprodutível com uma precisão de 20% e valores de exatidão  $\pm 20\%$ . Assim sendo, definiu-se o LLOQ (limite inferior de quantificação) como a concentração mais baixa de cada analito.

Tanto os valores de LOD como os valores de LLOQ obtidos são satisfatórios, tendo em conta o reduzido volume de amostra (500  $\mu\text{L}$ ) e o facto de se tratar de cromatografia líquida. Contextualizando com os resultados alcançados em outros trabalhos pode-se considerar que os mesmos foram adequados. Palego *et al.* (2001)<sup>[242]</sup> descreveu para a CLP um LOD de 10  $\mu\text{g/mL}$  e um LLOQ de 25  $\mu\text{g/mL}$  para um volume de amostra de 1 mL utilizando SPE/HPLC-DAD como metodologia analítica. No presente trabalho obtivemos melhores resultados, uma vez que para o mesmo fármaco o LOD foi inferior a 0,1  $\mu\text{g/mL}$  e o LLOQ 0,1  $\mu\text{g/mL}$ . Contudo, como já mencionado anteriormente, ambos os limites dependem de vários fatores como o tipo de analito, o tipo de matriz da amostra, assim como da metodologia escolhida para análise. No trabalho atrás referido, a metodologia analítica utilizada foi a mesma que o presente trabalho (UHPLC-PDA), no entanto, a técnica de extração foi por SPE e a matriz usada foi o plasma. Assim sendo, compararam-se os resultados obtidos com outros trabalhos que tinham utilizado a mesma matriz em estudo, urina, e/ou a mesma técnica de extração para os analitos em questão (MEPS). Unceta *et al.* (2008)<sup>[52]</sup> utilizaram a SPME/HPLC-DAD para a determinação do citalopram, da FLX e respetivos metabolitos ativos em amostras de urina, adquirindo valores de LOD

de 0,010 µg/mL para a FLX e NORFLX. Estes valores foram ligeiramente melhores que os do presente trabalho, no entanto, não apresentaram quaisquer valores de LOQ. Mais recentemente Souza *et al.* (2015)<sup>[243]</sup> caracterizaram para a FLX um LLOQ de 0,05 ng/mL e para a CLP 0,10 ng/mL com apenas 200 µL de amostra de plasma, utilizando MEPS/LC-MS/MS como método analítico. Estes resultados são visivelmente melhores que os obtidos no presente trabalho.

Comparando os resultados destes estudos, verifica-se que as metodologias de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa apresentaram valores de LOD e LLOQ na escala dos ng, o que é compreensível, uma vez que tem a capacidade para detetar/quantificar níveis muito baixos. Porém, verifica-se que as técnicas miniaturizadas conseguem obter valores de LOD e LOQ mais baixos do que as restantes técnicas, como a SPE, sendo uma mais valia para os laboratórios analíticos.

#### 5.2.4. Precisão e Exatidão

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e de precisão intermédia. Para tal três níveis de concentração diferentes, nível baixo (LL), médio (ML) e alto (HL) da curva de calibração (0,1 µg/mL, 2,5 µg/mL e 5,0 µg/mL, respetivamente) foram preparados por fortificação de amostras brancas de urina.

A repetibilidade foi avaliada em simultâneo com o primeiro dia do estudo da precisão intermédia, sendo analisadas seis réplicas ( $n = 6$ ) no mesmo dia. Depois de aplicado o método obtiveram-se as áreas relativas para cada substância, em replicado e calculou-se a média, o desvio padrão ( $s$ ) e o coeficiente de variação ( $CV$  ou  $RSD$ ), segundo as **equações 5 e 6**. Os resultados obtidos encontram-se na tabela seguinte.

**Tabela 18.** Resumo dos resultados obtidos no estudo da repetibilidade do método, para cada um dos compostos em estudo, calculados para três níveis de concentração por MEPS/UHPLC-PDA.

Antidepressivo	Nível de Concentração <sup>a</sup> (µg/mL)	Média das áreas relativas (área analito/área PI)	Desvio padrão (s)	Repetibilidade (CV %) (n=6)
FLX	LL 0,1	0,0185	0,0012	6,3
	ML 2,5	0,5362	0,0247	4,6
	HL 5,0	1,0365	0,0420	4,1
NORFLX	LL 0,1	0,0225	0,0013	5,6
	ML 2,5	0,5486	0,0187	3,4
	HL 5,0	1,0999	0,0560	5,1
CLP	LL 0,1	0,0105	0,0004	3,6
	ML 2,5	0,3638	0,0113	3,1
	HL 5,0	0,7443	0,0226	3,0
DESCLP	LL 0,1	0,0120	0,0007	6,1
	ML 2,5	0,3233	0,0187	5,8
	HL 5,0	0,6401	0,0456	7,1

<sup>a</sup> Níveis de concentração usados na validação da MEPS/UHPLC-PDA: LL – nível baixo; ML – nível médio; HL – nível alto.

Através das áreas relativas das substâncias em estudo verificou-se que os CV foram <10% para as concentrações estudadas, cumprindo com os critérios estabelecidos pelos guias internacionais [225], concluindo-se, portanto que o método é preciso entre ensaios do mesmo dia.

Para a avaliação da precisão intermédia, analisaram-se igualmente três réplicas de cada nível durante cinco dias não consecutivos (n = 15), preparando-se uma curva de calibração para cada dia. Uma vez aplicado o procedimento de ensaio, os resultados deste estudo foram tratados por aplicação da ANOVA fator único usando as expressões da **Tabela 7** e da **Tabela 8**. Os resultados obtidos dessas expressões encontram-se resumidos na **Tabela 19**. Em anexo, encontram-se as tabelas detalhadas, com os dados das curvas de calibração obtidas para a precisão intermédia, assim como o tratamento estatístico destes resultados, para cada antidepressivo.

A metodologia experimental utilizada para o estudo da exatidão foi a mesma que foi descrita para a precisão intermédia. Esta foi expressa como *EMR* para os três níveis de concentração, sendo calculada segundo a **equação 7**. Os resultados do cálculo de *EMR* encontram-se também na **Tabela 19**.

**Tabela 19.** Resumo dos resultados obtidos no estudo da precisão e exatidão do método, para cada um dos compostos em estudo, calculados para três níveis de concentração por MEPS/UHPLC-PDA.

Analito	Concentração (µg/mL)		Repetibilidade (Sr)	Precisão entre sequências (Srun)	Precisão intermédia (S1)	CV (%)	EMR (%)
	Teórica	Obtida					
FLX	0,1	0,107	0,007	0,008	0,122	9,4	7,0
	2,5	2,499	0,011	0,017	0,169	0,7	-0,04
	5,0	5,001	0,011	0,007	0,135	0,2	0,02
NORFLX	0,1	0,107	0,005	0,008	0,112	7,8	7,0
	2,5	2,486	0,012	0,029	0,201	0,7	-0,56
	5,0	5,007	0,015	0,011	0,162	0,2	0,14
CLP	0,1	0,106	0,008	0,006	0,115	6,6	6,0
	2,5	2,488	0,011	0,013	0,155	0,5	-0,48
	5,0	5,006	0,008	0,005	0,112	0,1	0,12
DESCLP	0,1	0,103	0,007	0,006	0,115	7,0	3,0
	2,5	2,494	0,010	0,013	0,151	0,6	-0,24
	5,0	5,003	0,008	0,005	0,115	0,1	0,06

Podemos verificar que os valores de CV obtidos para a precisão intermédia são iguais ou inferiores a 9,4%, estando de acordo com os critérios anteriormente referidos.

Relativamente à exatidão, os valores absolutos obtidos variam entre 0,02 e 7,0%, os quais se encontram dentro dos limites considerados aceitáveis:  $\pm 20\%$  perto do LOQ e  $\pm 15\%$  nas restantes concentrações. Porém, a presença de erros sistemáticos (tendências) foi também investigada para este parâmetro, para cada nível de concentração. Para tal, utilizou-se um teste estatístico de modo a inferir se a recuperação média (%) era estatisticamente diferente da unidade. Os resultados obtidos encontram-se descritos na tabela seguinte.

**Tabela 20.** Resumo dos resultados obtidos no teste de hipóteses (teste *t-Student*) para o estudo dos erros sistemáticos associados à recuperação do método por MEPS/UHPLC-PDA.

Antidepressivo	Concentração (µg/mL)	$\bar{R}$	$t_{exp}$	Critério de decisão $t_{exp} \leq t_{crit}(N-1;0,95)$
FLX	0,1	100,7	0,15	2,78
	2,5	99,9	0,15	
	5,0	100,0	0,15	
NORFLX	0,1	107,1	1,90	
	2,5	99,4	1,89	
	5,0	100,1	1,88	
CLP	0,1	106,3	2,01	
	2,5	99,5	2,01	
	5,0	100,1	2,01	
DESCLP	0,1	103,1	0,98	
	2,5	99,8	0,98	
	5,0	100,1	0,98	

Os resultados obtidos evidenciam que o  $t_{exp}$  foi sempre inferior ao  $t_{crit}$  para um intervalo de confiança de 95% para todos os ADs, concluindo-se ausência de erros sistemáticos, comprovando assim a exatidão do método. Além disso, os valores das taxas de recuperação encontram-se no intervalo de valores, definido por uma margem de erro de 20% que varia entre 80 a 120% [207].

### 5.2.5. Eficiência de extração

O estudo da eficiência de extração foi realizado segundo o procedimento descrito no ponto 4.6.6. Na **Tabela 21** expressam-se os valores obtidos da avaliação deste parâmetro através da equação 15, em percentagem, da extração por MEPS para os compostos em estudo presentes na matriz biológica.

**Tabela 21.** Resultados da determinação da eficiência de extração por MEPS para três níveis de concentração.

Antidepressivo	EE (%)		
	LL (0,1 µg/mL)	ML (2,5 µg/mL)	HL (5,0 µg/mL)
FLX	98,8	96,6	98,0
NORFLX	90,4	94,1	96,9
CLP	84,5	86,8	92,1
DESCLP	86,8	91,8	93,7

Os valores obtidos para a recuperação da extração variam entre 84,5% e 98,8% não havendo perdas significativas de analito no processo extrativo. Uma vez que os valores de recuperação revelaram-se satisfatórios, podemos considerar que a técnica por MEPS é adequada para a extração dos ADs em amostras de urina.

### 5.3. Otimização do procedimento de extração por QuEChERS

Após pesquisa bibliográfica, constatamos que, até à data da realização deste trabalho, não foi encontrada uma aplicação do QuEChERS na extração de ADs em amostras de urina. Posto isto, foi necessário otimizar alguns parâmetros como volume de amostra, seleção do solvente e sais de extração e influência da etapa do *clean up* de modo a maximizar a eficiência de extração.

Para a otimização do procedimento QuEChERS, partiu-se da metodologia original proposta por Anastassiades *et al.*<sup>[153]</sup> As condições experimentais inicialmente utilizadas encontram-se descritas na **Tabela 22**.

**Tabela 22.** Condições experimentais otimizadas do QuEChERS

<b>Etapas do QuEChERS</b>	<b>Condições experimentais</b>
<i>Extração</i>	10 mL urina fortificada +
	10 mL ACN
<i>Partição</i>	4g MgSO <sub>4</sub> + 1g NaCl
	150 mg/mL MgSO <sub>4</sub>
<i>Limpeza (clean up)</i>	+
	25 mg/mL PSA

Após a extração, o sobrenadante obtido na etapa do *clean up* foi evaporado até à secura sob corrente de azoto e 100 µL de fase móvel de entrada (H<sub>2</sub>O (0,1% FA)/acetonitrilo, 90:10, v/v) foi adicionado. Uma alíquota de 2 µL foi injetada no sistema cromatográfico UHPLC-PDA.

Tal como na MEPS, as amostras brancas de urina utilizadas no processo de otimização foram provenientes de voluntários do CQM não consumidores de ADs. Todo o processo de otimização foi realizado em triplicado, utilizando amostras de urina fortificadas com os padrões dos ADs a uma concentração de 10 µg/mL. As condições

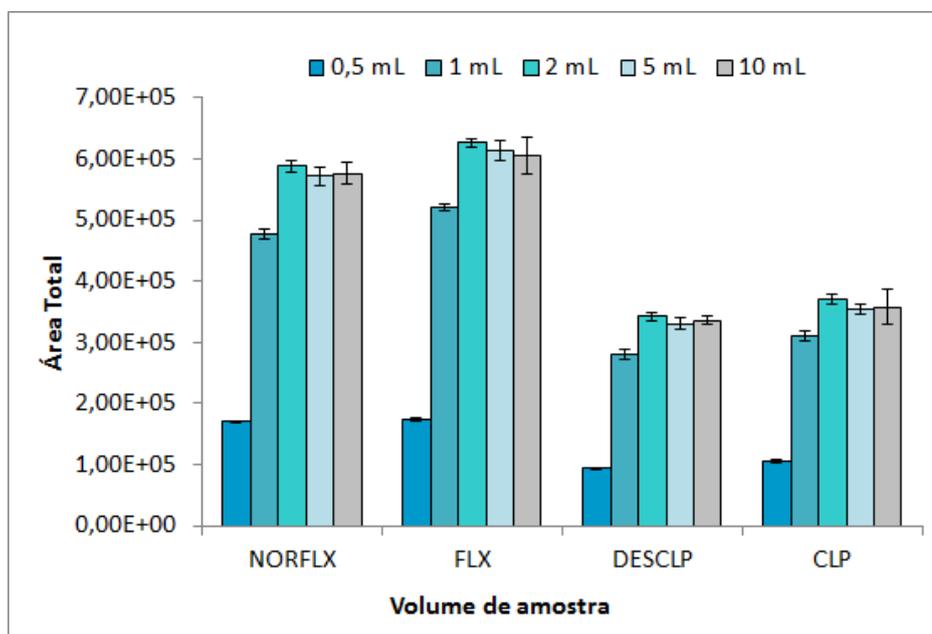
ótimas foram selecionadas pela totalidade das áreas dos picos de cada analito, obtidas em cada parâmetro.

### 5.3.1. Volume de amostra

Para garantir uma maior eficiência do procedimento de extração e de modo a selecionar a menor quantidade possível de amostra, vários volumes foram testados. A otimização foi iniciada utilizando a quantidade de amostra descrita na metodologia original [153], nomeadamente 10 mL, sendo posteriormente reduzida para 5 mL, 2 mL, 1 mL e por fim 0,5 mL.

Para cada volume de amostra testado, reduziu-se proporcionalmente todas as medições e pesagens do procedimento, ou seja, para o volume de 5 mL reduziu-se igualmente para metade o volume de acetonitrilo (5 mL) e as massas dos sais de extração (2g de MgSO<sub>4</sub> e 0,5g de NaCl).

Os resultados encontram-se apresentados na figura seguinte:



**Figura 30.** Influência do volume de amostra no processo de extração por QuEChERS.

Verifica-se que à medida que o volume de amostra aumenta, há um aumento nas áreas de cada antidepressivo. Contudo, podemos constatar que a partir dos 2 mL há uma ligeira diminuição das áreas, o que poderá indicar uma saturação dos analitos com o

solvente e os sais de extração. Além disso, é possível observar um aumento das barras de erro nos volumes de 5 e 10 mL. Por esta razão, o volume de 2 mL mostrou ser a quantidade ideal de amostra para se obter uma boa eficiência de extração.

### 5.3.2. Escolha do solvente de extração

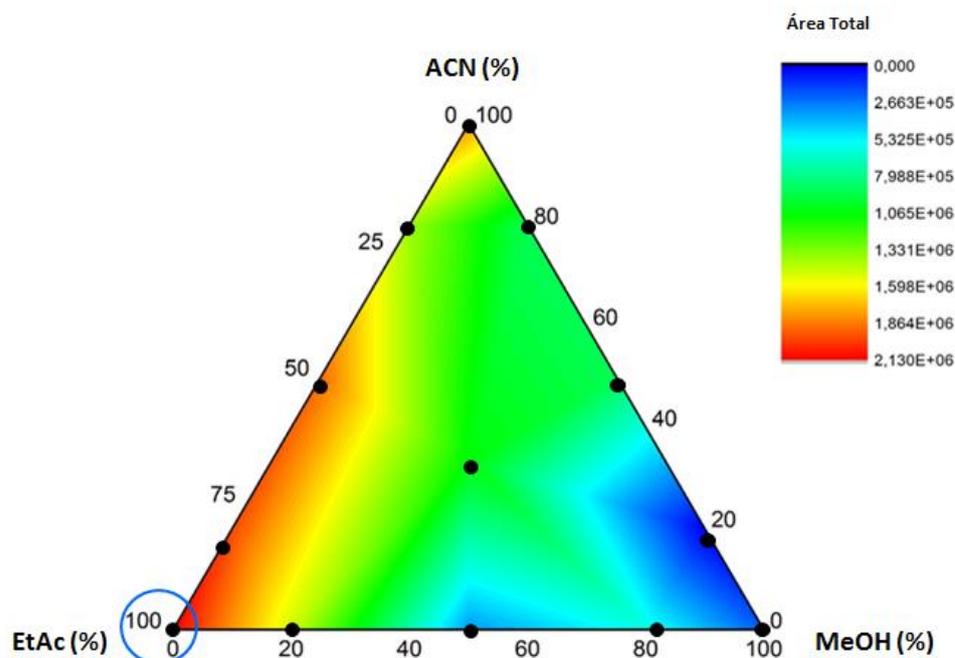
A seleção do solvente de extração é um dos pontos fundamentais no QuEChERS. Alguns aspectos devem ser considerados, tais como, a capacidade de extração de compostos com diferentes polaridades, deve apresentar seletividade durante a extração, partição e *clean-up*, deve ser compatível com diferentes técnicas cromatográficas, apresentar baixo custo e segurança [160].

Para avaliar este parâmetro, diferentes solventes foram testados, nomeadamente, o acetato de etilo (EtAc), o metanol e o acetonitrilo, e diversas combinações entre estes, foram avaliadas. Na Tabela seguinte encontram-se descritos os solventes e combinações testadas.

**Tabela 23.** Solventes testados no processo de extração por QuEChERS.

Solventes e Combinações Testadas	
100% MeOH	MeOH:ACN (80:20, v/v)
100% ACN	ACN:MeOH (80:20, v/v)
100% EtAc	ACN:EtAc (80:20, v/v)
MeOH:ACN (50:50, v/v)	EtAc:ACN (80:20, v/v)
ACN:EtAc (50:50, v/v)	EtAc:MeOH (80:20, v/v)
MeOH:EtAc (50:50, v/v)	MeOH:EtAc (80:20, v/v)
MeOH:ACN:EtAc (33:33:33, v/v/v)	

Na **Figura 31** está representado um gráfico ternário do sistema de solventes de extração avaliados assim como das combinações realizadas.



**Figura 31.** Gráfico ternário do sistema de solventes de extração (evidenciado pela marcação a azul) obtido pelo *software* OriginLab® 9.0.

Tal como já descrito na **secção 5.2.5**, cada ponto preto do gráfico corresponde a uma composição diferente dos três solventes testados. Os valores do lado direito superior indicam a área total obtida para todos os ADs.

Os melhores resultados foram obtidos usando 100% de acetato de etilo como solvente de extração. Este solvente aumenta a eficiência de extração de compostos apolares e tem vindo a ser utilizado no QuEChERS, como um substituto mais seguro aos solventes clorados<sup>[244]</sup>. Além disso, tem demonstrado ser um solvente com características universais, uma vez que possui capacidade para extrair pesticidas de diferentes classes em diversos tipos de amostras<sup>[160]</sup>, o que poderá justificar a sua eficiência de extração dos analitos em estudo em amostras de urina. Por outro lado, a solução 100% metanol foi a que obteve os piores resultados em termos de eficiência de extração.

Testou-se, ainda, a solução água contendo 0,1% ácido fórmico como solvente de extração, contudo não se obteve uma boa separação das fases dado que a matriz em estudo é aquosa.

Após a seleção do melhor solvente de extração, procedeu-se à otimização do efeito *salting out*.

### 5.3.3. Efeito *salting out*

O sulfato de magnésio e o cloreto de sódio são os sais utilizados no método QuEChERS original. A adição destes sais na etapa de partição promove o efeito de *salting out*, no qual as moléculas de água formam esferas de hidratação em torno destes sais iônicos reduzindo, assim, a solubilidade dos analitos na fase aquosa, como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa. Deste modo, a eficiência de extração é favorecida [155].

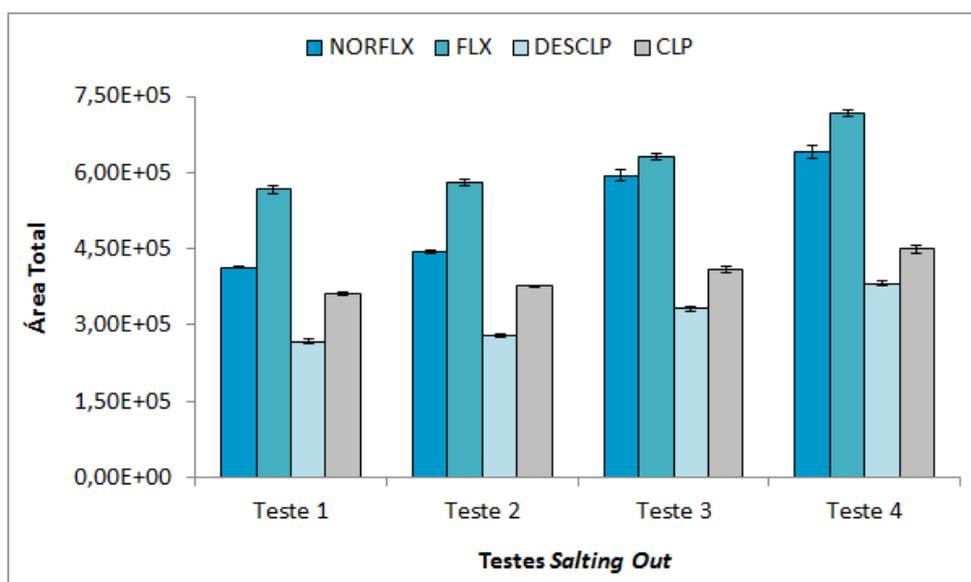
Tal como já foi referido na **secção 3.2.4.** em 2005 a técnica foi modificada com a introdução de sais tampão, como o citrato de trisódio dihidratado ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ) e o hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado ( $C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1,5H_2O$ ). A inclusão destes sais na metodologia QuEChERS permitiu a obtenção de melhores percentagens de recuperação.

Para a avaliação deste parâmetro na etapa de extração/partição, realizaram-se 4 testes. Cada teste foi realizado com 2 mL de urina fortificada com os ADs a uma concentração de 10 µg/mL e 2 mL de EtAc. As condições avaliadas encontram-se na tabela seguinte:

**Tabela 24.** Testes realizados para avaliar o efeito de *salting out*.

Teste <i>salting out</i>	Condições Experimentais
1	0,8g de $MgSO_4$
2	0,2g de NaCl
3	0,8g de $MgSO_4$ + 0,2g de NaCl
4	0,8g de $MgSO_4$ + 0,2g de NaCl + 0,2g $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ + 0,1g $C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1,5H_2O$

Os resultados de cada teste encontram-se representados graficamente na figura seguinte:



**Figura 32.** Efeito do *salting out* na etapa de extração/ partição do QuEChERS.

Pode-se observar que em termos de áreas, o teste 4 foi o que obteve melhores resultados. Anastassiades *et al.*<sup>[245]</sup> e Lehotay *et al.*<sup>[159]</sup> verificaram que a introdução dos sais tamponantes permitia a modelação do pH da amostra (5,0 – 5,5), favorecendo a interação dos analitos com o solvente de extração. Conclui-se, portanto, que a combinação dos sais sulfato de magnésio, cloreto de sódio, citrato de trisódio dihidratado e hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado com o solvente orgânico proporciona uma melhor separação das fases orgânica e aquosa, levando a uma extração mais rápida e fácil.

Verificou-se, ainda, que a adição de um só sal (teste 1 e 2) nesta etapa é também eficiente, apesar da menor área total. A presença do sal secante  $MgSO_4$  é fundamental, uma vez que apresenta grande capacidade de remoção de água quando comparado com outros sais. Além disso, o facto de sofrer uma reação exotérmica quando hidratado favorece a extração, especialmente dos compostos apolares<sup>[160]</sup>.

Com base nos resultados, a mistura dos 4 sais de extração foi a selecionada para o efeito *salting out* na etapa de extração e partição do QuEChERS. De modo a facilitar a interação dos sais e do solvente com os analitos presentes na matriz, a amostra foi homogeneizada, por agitação manual e com o auxílio do vórtex, sendo posteriormente centrifugada a 3000 rpm, durante 5 min.

### 5.3.4. Influência do *clean up*

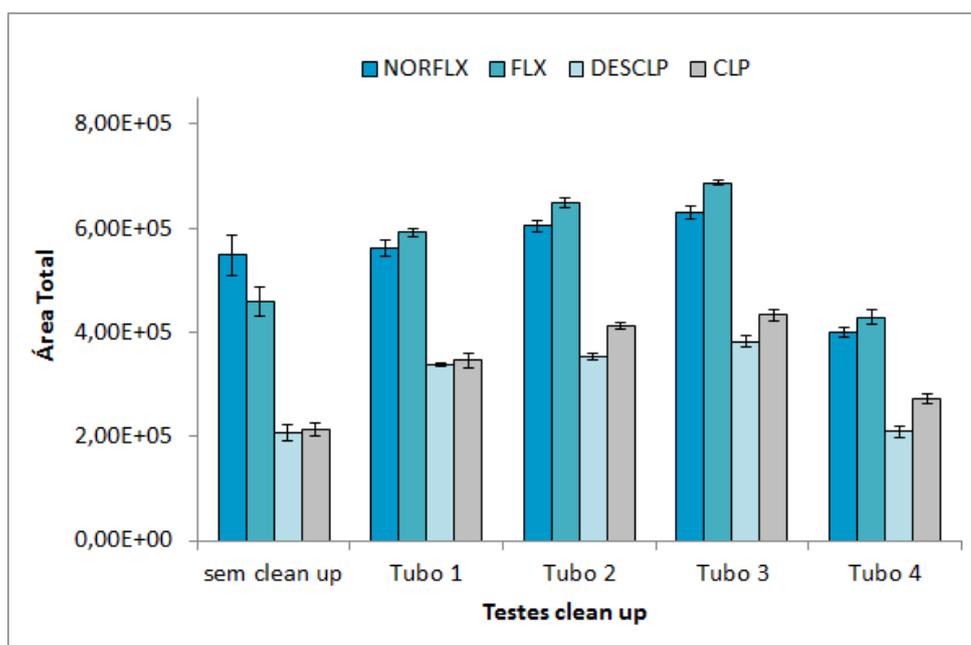
Como referido na **secção 4.5.2.** a etapa do *clean up* é essencial para promover a robustez e confiança dos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico. No caso do QuEChERS, o processo do *clean up* é realizado por dSPE, a qual permite que a limpeza e a redução de água residual sejam realizadas em simultâneo e de forma rápida. A remoção de água fornece, assim, um extrato final de menor polaridade, facilitando a precipitação dos interferentes polares <sup>[155]</sup>.

Para a avaliação deste parâmetro, realizou-se um teste sem a etapa do *clean up* e quatro testes com a etapa do *clean up*. Para o procedimento sem a etapa do *clean up*, uma alíquota de 2 µL de extrato foi injetada no sistema cromatográfico UHPLC-PDA. Em relação aos testes com a etapa do *clean up*, foram testados diferentes tubos dSPE DisQuE™, disponíveis no laboratório contendo diferentes misturas de sorventes. A composição de cada tubo *clean up* DisQuE™ testado encontra-se descrita na tabela seguinte:

**Tabela 25.** Composição tubos *clean up* DisQuE™ testados.

<b>Tubos <i>clean up</i> DisQuE™</b>	<b>Composição</b>
<b>1</b>	150 mg de MgSO <sub>4</sub>
<b>2</b>	150 mg de MgSO <sub>4</sub> + 25 mg de PSA
<b>3</b>	150 mg de MgSO <sub>4</sub> + 25 mg de PSA + 25 mg de C <sub>18</sub>
<b>4</b>	150 mg de MgSO <sub>4</sub> + 50 mg de PSA + 50 mg de C <sub>18</sub>

Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 33.**



**Figura 33.** Influência da etapa do *clean up* na eficiência de extração por QuEChERS.

Com base nos dados da **Figura 33** verifica-se que o tubo 3 apresentou os melhores resultados em termos de áreas para todos os ADs. A mistura de 150 mg de  $MgSO_4$ , 25 mg de PSA e 25 mg de  $C_{18}$  mostrou ser a mais eficiente, quando comparada com a dos outros tubos. No caso do teste sem *clean up* verificou-se muitos interferentes no cromatograma, o que dificultou, em parte, a determinação das áreas de cada analito. O mesmo foi verificado para o tubo 1, com apenas sulfato de magnésio, que apesar de apresentar maior área que o teste sem *clean up*, apresentou muita interferência em termos cromatográficos. Podemos, assim, concluir que a etapa do *clean up* é um passo fundamental no QuEChERS, uma vez que a componente dispersiva permite a distribuição dos sais para que se difundam ao longo de toda a amostra para uma extração mais completa <sup>[155]</sup>.

Em relação aos tubos 2 e 4, ambos continham sulfato de magnésio e PSA, sendo que o tubo 4 dispunha do dobro da quantidade de PSA além do sorvente  $C_{18}$ . Quando comparámos os tubos 2, 3 e 4, verificámos que o tubo 4 apresentou os resultados mais baixos de áreas totais, o que indica que ao aumentar a quantidade de  $C_{18}$  e de PSA, os analitos começam a ficar retidos nestes sorventes, diminuindo assim a eficiência de extração.

Verificou-se, ao nível da otimização da MEPS, que o sorvente C<sub>18</sub> foi o que obteve melhor eficiência de extração, dada a sua afinidade para com os analitos em estudo, o que justifica os baixos resultados para o tubo 4. Além disso o sorvente PSA é eficaz na remoção de ácidos orgânicos, de açúcares e de outros compostos polares presentes na matriz [156].

Entre o tubo 2 e 3, constata-se que a diferença é mínima em relação às áreas, sendo ligeiramente maior para o tubo 3. No entanto em termos cromatográficos observámos menos interferentes no tubo 3. Assim sendo, o tubo *clean up* contendo 150 mg de MgSO<sub>4</sub>, 25 mg de PSA e 25 mg de C<sub>18</sub> foi o selecionado.

Na **Tabela 26** encontram-se apresentadas as condições otimizadas do QuEChERS.

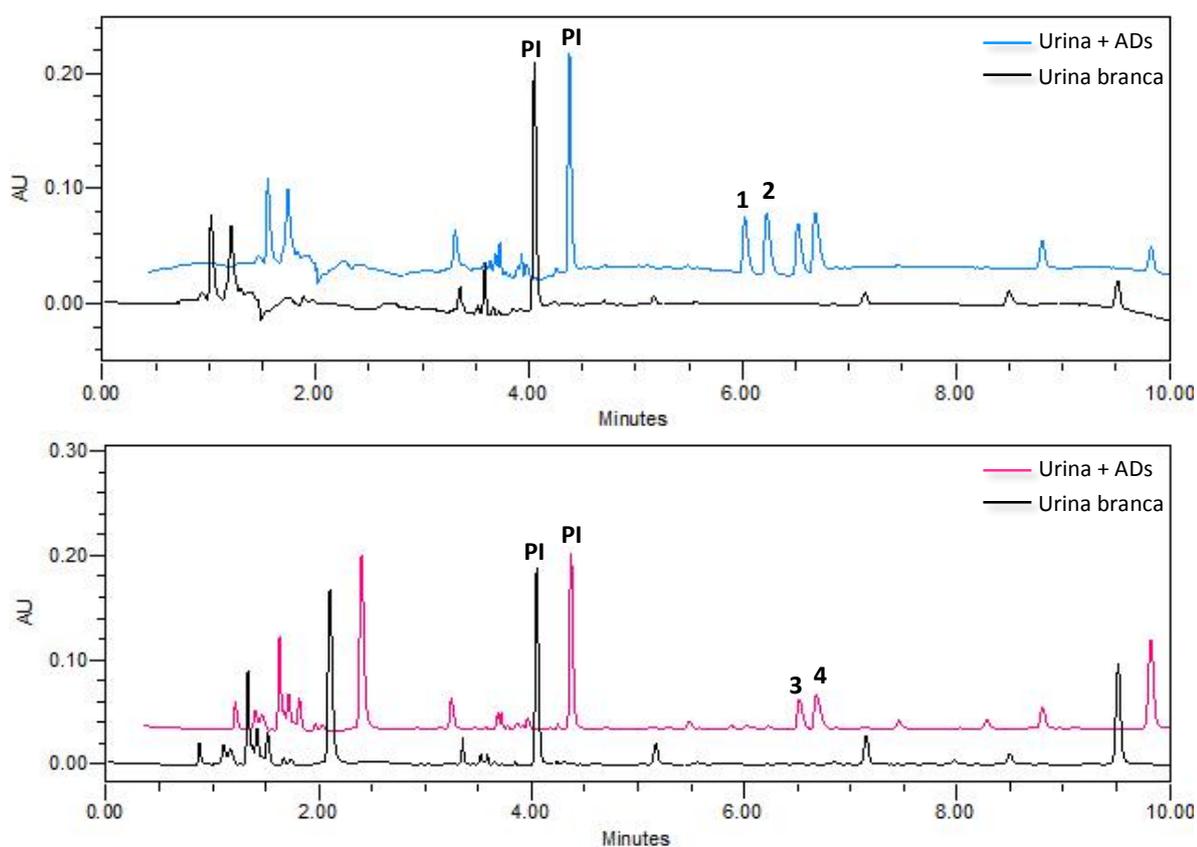
**Tabela 26.** Condições experimentais otimizadas do QuEChERS.

<b>Etapas do QuEChERS</b>	<b>Condições experimentais otimizadas</b>
<i>Extração</i>	2 mL urina fortificada + 2 mL EtAc
<i>Partição</i>	0,8g de MgSO <sub>4</sub> + 0,2g de NaCl + 0,2g C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O + 0,1g C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ·1,5H <sub>2</sub> O
<i>Limpeza (clean up)</i>	150 mg de MgSO <sub>4</sub> + 25 mg de PSA + 25 mg de C <sub>18</sub>

#### 5.4. Validação do método analítico para a análise de antidepressivos por QuEChERS/UHPLC-PDA

##### 5.4.1. Seletividade

A seletividade do método QuEChERS foi igualmente definida através da avaliação da pureza na zona dos picos cromatográficos obtidos, tendo em conta a forma do pico, o tempo de retenção e o espectro de absorção UV, para a deteção de possíveis interferentes da matriz. Tal como referido anteriormente, as substâncias foram identificadas comparando os tempos de retenção (RT) e o comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) de cada uma delas (ver **Tabela 14**). Na **Figura 34** estão apresentados os cromatogramas obtidos e respetivos espectros de absorção UV de cada uma das substâncias, após extração por QuEChERS.



**Figura 34.** Comparação dos cromatogramas de amostra de urina branca com os cromatogramas de urina fortificada com os analitos em estudo a diferentes comprimentos de onda após extração por QuEChERS ( $C = 2,5 \mu\text{g/mL}$ ); **(A)** 227 nm e **(B)** 252 nm. (1 – NORFLX; 2 – FLX; 3 – DESCLP; 4 – CLP; PI – padrão interno – clozapina).

Através da comparação dos cromatogramas da amostra de urina branca com os da amostra de urina fortificada com os analitos, verificou-se que não há quaisquer interferências de constituintes da matriz nos tempos de retenção e comprimento de onda máximo de cada uma das substâncias em estudo, permitindo concluir que o método é seletivo.

#### 5.4.2. Linearidade

A linearidade do método QuEChERS/UHPLC-PDA foi igualmente estudada através da construção de quatro curvas de calibração (uma para cada substância), com 7 níveis de concentrações entre 0,1 a 5  $\mu\text{g/mL}$ , em triplicado. Tal como na MEPS, cada curva de calibração foi construída pela relação entre a razão das áreas (área do analito/área do PI) com as concentrações do analito, através da aplicação da ferramenta ANOVA. Na **Figura**

35 encontram-se representadas as curvas de calibração de cada antidepressivo em estudo.

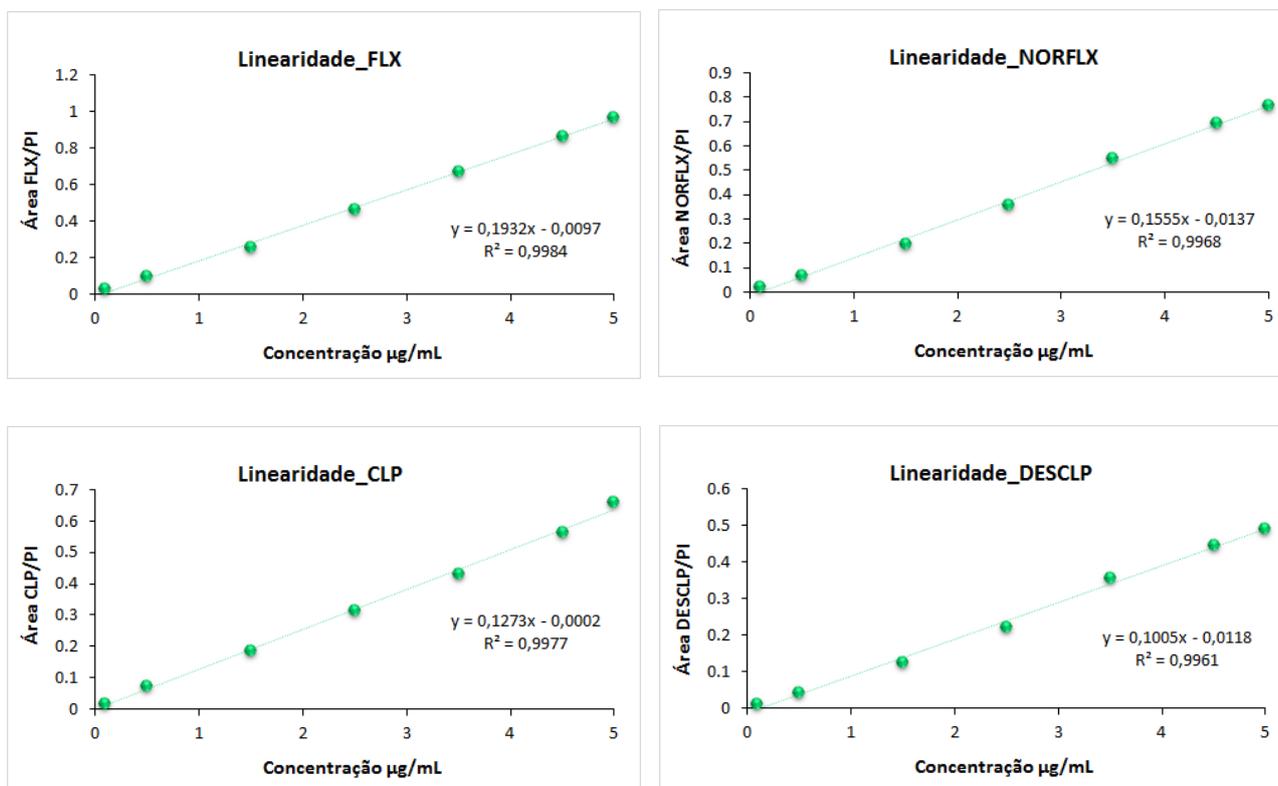


Figura 35. Curvas de calibração obtidas para cada antidepressivo.

Na Tabela 27, encontram-se resumidos os resultados deste estudo e os estudos estatísticos de regressão estão sumariados em anexo. A análise da regressão linear com o método dos mínimos quadrados apresentou valores de  $R$  e  $R^2$  superiores a 0,99, para todos os compostos em estudo, e o intervalo de interceção da ordenada na origem não foi estatisticamente diferente do ponto zero. Relativamente à distribuição dos resíduos ao longo dos valores de concentração, não foram observadas tendências, uma vez que todos os resíduos evidenciaram um desvio inferior a 10%.

Tabela 27. Resumo dos resultados obtidos relativos ao modelo de regressão linear para os ADs em estudo por QuEChERS/UHPLC-PDA.

Antidepressivo	Equação da reta	$R^2$	Intervalo de 95% de confiança da ordenada na origem	
			Limite inferior	Limite superior
FLX	$y = 0,1932x - 0,0097$	0,9984	-0,0374	0,0180
NORFLX	$y = 0,1555x - 0,0137$	0,9968	-0,0654	0,0078
CLP	$y = 0,1273x - 0,0002$	0,9977	-0,0220	0,0215
DESCLP	$y = 0,1005x - 0,0118$	0,9961	-0,0339	0,0103

Tal como na MEPS, foi igualmente avaliada a linearidade da metodologia por QuEChERS/UHPLC-PDA, utilizando o teste de Mandel, de modo a verificar qual dos dois modelos de regressão, linear e não linear (polinomial) se adequava melhor. Na **Tabela 28** encontram-se os valores do teste de Mandel ( $TV$ ) calculados segundo a **equação 3** e os valores tabelados da distribuição  $F$  de Snedecor ( $N-1;N-1;0,95$ ) ( $F_{crit}$ ).

**Tabela 28.** Resumo dos resultados obtidos relativos ao modelo de regressão linear para os ADs em estudo por QuEChERS/UHPLC-PDA.

Antidepressivo	Teste de Mandel ( $TV$ )	Critério de decisão $TV \leq F_{crit} (0,95;1;N-3)$
FLX	5,66	$TV \leq 7,71 F (0,95;1;4)$
NORFLX	2,11	
CLP	3,97	
DESCLP	1,22	

Como os valores de  $TV$  foram inferiores aos de  $F_{crit} (0,95;1;N-3)$  para todos os ADs, os resultados indicam que, na gama de trabalho escolhida, o modelo linear é o que melhor se ajusta aos pontos da curva de calibração obtidos em vez da função polinomial.

#### 5.4.3. Limites de Detecção e Quantificação

Estes dois parâmetros foram estudados como na metodologia por MEPS/UHPLC-PDA, ou seja, utilizando o método de calibração. O cálculo dos limites foi também efetuado utilizando as **equações 4 e 5**, tendo como base os dados das curvas de calibração obtidas na linearidade, para cada composto em estudo. Os valores do LOD e LOQ calculados encontram-se na **Tabela 29**.

**Tabela 29.** Valores de LOD e LOQ calculados para cada antidepressivo em estudo.

Antidepressivo	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
FLX	0,060	0,181
NORFLX	0,084	0,255
CLP	0,071	0,216
DESCLP	0,092	0,278

Tal como na MEPS, os valores de LOQ obtidos para o QuEChERS são superiores ao primeiro ponto da curva de calibração (0,1 µg/mL) para todos os ADs. Assim sendo, definiu-se, igualmente, o LLOQ (limite inferior de quantificação) como a concentração mais baixa de cada analito (0,1 µg/mL).

Uma vez que não foram encontrados na literatura, trabalhos com aplicação do QuEChERS na extração destes ADs em amostras de urina, comparámos os valores de LOD e LLOQ com trabalhos que utilizaram esta técnica noutras matrizes para a extração de ADs. Usui *et al.* (2012)<sup>[170]</sup> descreveram para a CLP um LOD de 0,73 ng/mL e um LOQ de 5,0 ng/mL, utilizando um método por QuEChERS modificado combinado com LC-MS/MS. Estes valores são melhores que os obtidos no presente trabalho, devido, tal como referido na secção **5.2.3**, ao facto da espetrometria de massa ter a capacidade para detetar/quantificar níveis muito mais baixos, na ordem dos nanogramas.

Contudo, verificou-se que a técnica apresenta um grande potencial, pois os valores obtidos são ligeiramente inferiores aos da MEPS, exceto para a DESCLP que apresentou um LOD superior ao valor determinado por MEPS.

#### 5.4.4. Precisão e Exatidão

A precisão foi igualmente avaliada em termos de repetibilidade e de precisão intermédia. Tal como na metodologia MEPS/UHPLC-PDA, três níveis de concentração diferentes, nível baixo (LL), médio (ML) e alto (HL) da curva de calibração (0,1 µg/mL, 2,5 µg/mL e 5,0 µg/mL, respetivamente) foram preparados, por fortificação de amostras brancas de urina.

Em simultâneo com o primeiro dia do estudo da precisão intermédia, foi avaliada a repetibilidade do método, na qual seis réplicas (n = 6) foram analisadas no mesmo dia. Depois de aplicado o método adquiriram-se as áreas relativas para cada substância, em replicado e calcularam-se a média, o desvio padrão (s) e o coeficiente de variação (CV ou RSD), segundo as **equações 5 e 6**. Os resultados obtidos encontram-se na tabela seguinte.

**Tabela 30.** Resumo dos resultados obtidos no estudo da repetibilidade do método, para cada um dos compostos em estudo, calculados para três níveis de concentração por QuEChERS/UHPLC-PDA.

Antidepressivo	Nível de Concentração <sup>a</sup> (µg/mL)	Média das áreas relativas (área analito/área PI)	Desvio padrão (s)	Repetibilidade (CV %) (n=6)
FLX	LL 0,1	0,0284	0,0008	2,7
	ML 2,5	0,4321	0,0104	2,4
	HL 5,0	0,9859	0,0233	2,4
NORFLX	LL 0,1	0,0227	0,0006	2,6
	ML 2,5	0,3579	0,0064	1,8
	HL 5,0	0,7904	0,0149	1,9
CLP	LL 0,1	0,0175	0,0015	8,7
	ML 2,5	0,3028	0,0084	2,8
	HL 5,0	0,6418	0,0173	2,7
DESCLP	LL 0,1	0,0099	0,0099	7,4
	ML 2,5	0,2308	0,2308	4,5
	HL 5,0	0,4989	0,4989	1,5

<sup>a</sup> Níveis de concentração usados na validação da MEPS/UHPLC-PDA: LL – nível baixo; ML – nível médio; HL – nível alto.

Com base nos dados obtidos na tabela anterior, verifica-se que os CV foram <10% para as concentrações estudadas, concluindo-se que o método é preciso entre ensaios do mesmo dia.

A precisão intermédia foi avaliada tal como na metodologia por MEPS/UHPLC-PDA, na qual três réplicas de cada nível foram analisadas durante cinco dias não consecutivos (n = 15). Para cada dia, foi igualmente preparada uma curva de calibração e os resultados foram posteriormente tratados por aplicação da ANOVA fator único usando as expressões da **Tabela 7** e da **Tabela 8**. Os resultados obtidos dessas expressões encontram-se resumidos na **Tabela 31**. Em anexo, encontram-se as tabelas detalhadas, com os dados das curvas de calibração obtidas para a precisão intermédia, assim como o tratamento estatístico destes resultados, para cada antidepressivo.

A metodologia experimental utilizada para o estudo da exatidão foi a mesma que foi descrita para a precisão intermédia. Esta foi expressa como EMR para os três níveis de concentração, sendo calculada segundo a **equação 7**. Os resultados do cálculo de EMR encontram-se também na **Tabela 31**.

**Tabela 31.** Resumo dos resultados obtidos no estudo da precisão e exatidão do método, para cada um dos compostos em estudo, calculados para três níveis de concentração por QuEChERS /UHPLC-PDA.

Analito	Concentração (µg/mL)		Repetibilidade (Sr)	Precisão entre sequências (Srun)	Precisão intermédia (S1)	CV (%)	EMR (%)
	Teórica	Obtida					
FLX	0,1	0,094	0,011	0,004	0,122	8,3	-6,0
	2,5	2,512	0,022	0,008	0,172	0,6	0,48
	5,0	4,994	0,018	0,008	0,161	0,1	-0,12
NORFLX	0,1	0,102	0,007	0,009	0,129	9,9	2,0
	2,5	2,496	0,023	0,015	0,195	0,8	-0,16
	5,0	5,002	0,018	0,005	0,152	0,2	0,04
CLP	0,1	0,099	0,009	0,009	0,131	10,1	-1,0
	2,5	2,502	0,010	0,019	0,171	0,8	0,08
	5,0	4,999	0,022	0,008	0,172	0,2	-0,02
DESCLP	0,1	0,101	0,010	0,004	0,116	4,1	1,0
	2,5	2,498	0,014	0,002	0,127	0,3	-0,08
	5,0	5,001	0,011	0,005	0,129	0,1	0,02

Podemos verificar que os valores de CV obtidos para a precisão intermédia são iguais ou inferiores a 10,1%. Apesar de ligeiramente superior aos critérios (<10%), este valor foi considerado aceitável.

Relativamente à exatidão, os valores absolutos obtidos variaram entre 0,02 e 6,0%, os quais se encontram dentro dos limites considerados aceitáveis:  $\pm 20\%$  perto do LOQ e  $\pm 15\%$  nas restantes concentrações.

A presença de erros sistemáticos (tendências) também foi investigada através da aplicação de um teste estatístico. Os resultados obtidos encontram-se descritos na tabela seguinte.

**Tabela 32.** Resumo dos resultados obtidos no teste de hipóteses (teste *t-Student*) para o estudo dos erros sistemáticos associados à recuperação do método por QuEChERS/UHPLC-PDA.

Antidepressivo	Concentração (µg/mL)	$\bar{R}$	$t_{exp}$	Critério de decisão $t_{exp} \leq t_{crit}(N-1;0,95)$
FLX	0,1	93,7	1,82	2,78
	2,5	100,5		
	5,0	99,9		
NORFLX	0,1	102,2	0,48	
	2,5	99,8		
	5,0	100,0		
CLP	0,1	98,9	0,24	
	2,5	100,1		
	5,0	99,9		
DESCLP	0,1	101,2	0,66	
	2,5	99,9		
	5,0	100,0		

Os resultados obtidos mostram que o  $t_{exp}$  é inferior ao  $t_{crit}$  para todos os ADs com um intervalo de confiança de 95%. Conclui-se portanto que o método é exato, uma vez que não existem erros sistemáticos.

Os valores das taxas de recuperação adquiridos encontram-se no intervalo de valores, definido por uma margem de erro de 20% que varia entre 80 a 120%.

#### 5.4.5. Eficiência de extração

O estudo da eficiência de extração do método QuEChERS foi realizado segundo o procedimento descrito na secção 4.6.6. A **Tabela 33** apresenta os valores obtidos da avaliação deste parâmetro segundo a **equação 15**, em percentagem, da extração por QuEChERS para os compostos em estudo na urina.

**Tabela 33.** Resultados da determinação da eficiência de extração por QuEChERS para três níveis de concentração.

Antidepressivo	EE (%)		
	LL (0,1 µg/mL)	ML (2,5 µg/mL)	HL (5,0 µg/mL)
FLX	99,6	90,8	108,8
NORFLX	86,1	90,1	94,4
CLP	108,6	93,4	106,9
DESCLP	107,2	92,4	102,1

Podemos verificar que os valores de recuperação obtidos variam entre 86,1% e 108,8%, os quais estão de acordo com os critérios anteriormente referidos, não havendo perdas significativas de analito no processo extrativo. Os valores de recuperação foram igualmente satisfatórios, podendo-se considerar que a técnica por QuEChERS é igualmente adequada para a extração dos ADs em amostras de urina.

#### 5.5. Aplicação de ambas as metodologias, MEPS/UHPLC-PDA e QuEChERS/UHPLC-PDA, a amostras reais.

Após a validação das duas metodologias analíticas desenvolvidas para a determinação da FLX, CLP e respetivos metabolitos ativos em amostras de urina, aplicaram-se os dois métodos a 12 amostras reais, provenientes de pacientes sob tratamento com ADs. Estas amostras foram obtidas na Casa de Saúde S. João de Deus do Funchal (ISJD).

Foram selecionados os pacientes cujo tratamento envolvia os ADs em questão, nomeadamente FLX e CLP, com, pelo menos, 3 semanas. Todos os indivíduos que participaram neste estudo foram devidamente informados sobre a investigação, a qual foi previamente submetida à aprovação da Comissão de ética do ISJD e da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC).

A **Tabela 34** apresenta alguns dados das amostras dos pacientes analisados, como idade, tipo de fármaco e respetiva posologia e o tempo de tratamento.

**Tabela 34.** Informação das amostras dos pacientes.

Paciente	Idade	Dosagem terapêutica	Tempo de tratamento
1	55	CLP 75 mg	10 anos
2	61	FLX 20 mg	6 meses
3	51	FLX 20 mg	3 meses
4	49	FLX 20 mg	4 meses
5	67	FLX 20 mg	2 anos
6	52	FLX 20 mg	20 anos
7	72	FLX 20 mg	9 anos
8	30	FLX 20 mg	7 anos
9	28	FLX 20 mg	3 anos
10	60	FLX 40 mg	8 anos
11	57	CLP 25 mg	9 anos
12	52	CLP 25 mg	8 anos

As concentrações determinadas nas amostras de urina dos pacientes para as duas metodologias em estudo, MEPS/UHPLC-PDA e QuEChERS/UHPLC-PDA, encontram-se apresentadas na **Tabela 35** e na **Tabela 36**, respectivamente.

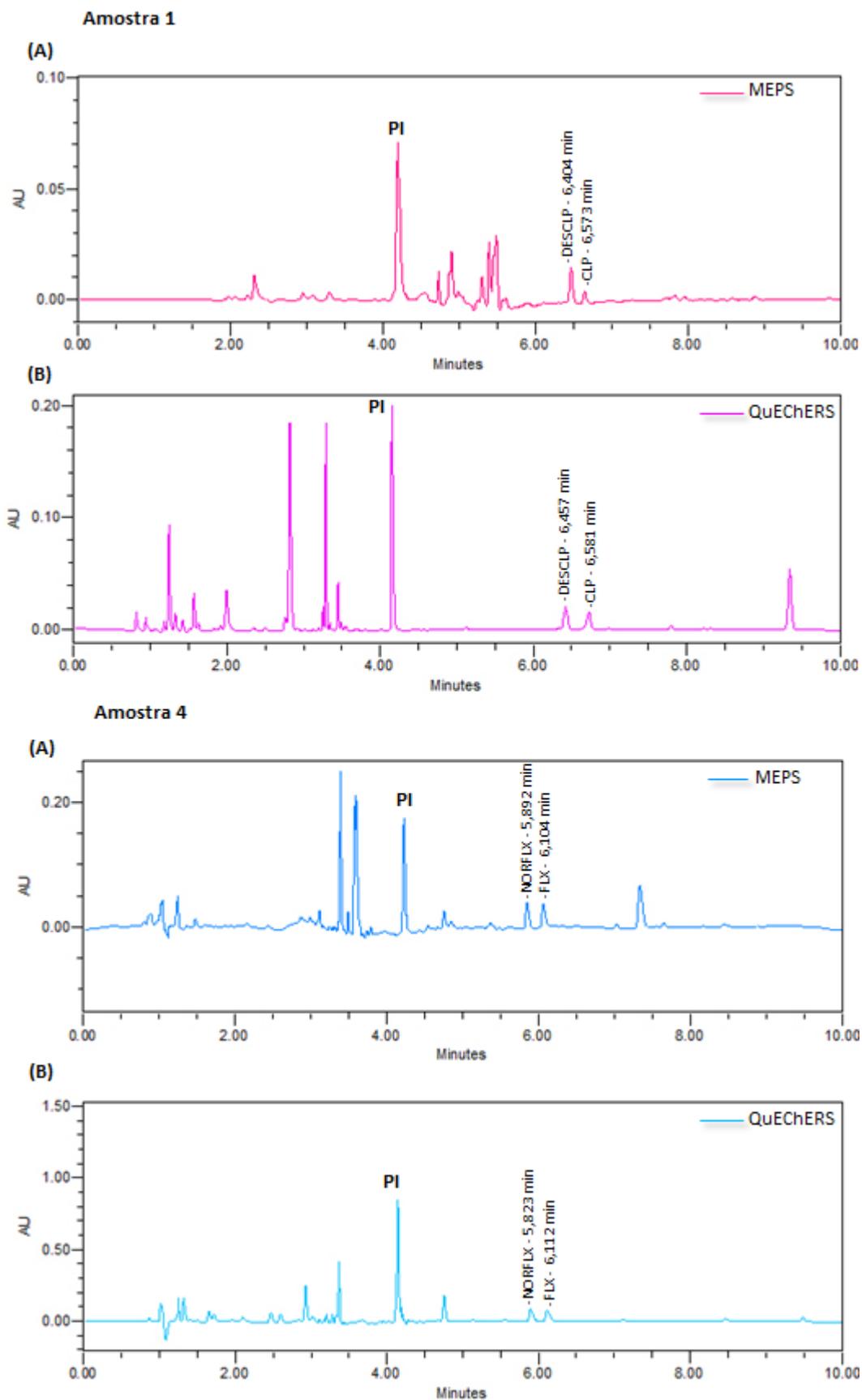
**Tabela 35.** Concentrações obtidas das amostras dos pacientes através do método MEPS/UHPLC-PDA

Paciente	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	FLX	NORFLX	CLP	DESCLP
1	-	-	$0,31 \pm 0,002$	$0,25 \pm 0,002$
2	$0,73 \pm 0,004$	$0,34 \pm 0,002$	-	-
3	$0,18 \pm 0,002$	$0,20 \pm 0,002$	-	-
4	$1,73 \pm 0,077$	$1,71 \pm 0,043$	-	-
5	$0,20 \pm 0,003$	$0,14 \pm 0,002$	-	-
6	$0,39 \pm 0,017$	$0,26 \pm 0,010$	-	-
7	$0,85 \pm 0,013$	$1,48 \pm 0,013$	-	-
8	-	-	$0,41 \pm 0,082$	$0,75 \pm 0,032$
9	-	-	$0,78 \pm 0,035$	$0,55 \pm 0,021$
10	$0,49 \pm 0,002$	$0,28 \pm 0,002$	-	-
11	$0,47 \pm 0,005$	$0,33 \pm 0,019$	-	-
12	$1,23 \pm 0,142$	$0,56 \pm 0,105$	-	-

**Tabela 36.** Concentrações obtidas das amostras dos pacientes através do método QuEChERS/UHPLC-PDA

Paciente	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	FLX	NORFLX	CLP	DESCLP
1	-	-	$0,23 \pm 0,012$	$0,20 \pm 0,018$
2	$0,65 \pm 0,021$	$0,31 \pm 0,011$	-	-
3	$0,15 \pm 0,009$	$0,18 \pm 0,015$	-	-
4	$1,56 \pm 0,068$	$1,58 \pm 0,052$	-	-
5	$0,13 \pm 0,034$	$0,17 \pm 0,026$	-	-
6	$0,30 \pm 0,017$	$0,28 \pm 0,010$	-	-
7	$0,73 \pm 0,006$	$1,41 \pm 0,013$	-	-
8	-	-	$0,46 \pm 0,076$	$0,68 \pm 0,042$
9	-	-	$0,65 \pm 0,028$	$0,52 \pm 0,018$
10	$0,51 \pm 0,008$	$0,38 \pm 0,011$	-	-
11	$0,32 \pm 0,013$	$0,21 \pm 0,022$	-	-
12	$1,12 \pm 0,073$	$0,41 \pm 0,064$	-	-

Em seguida são apresentados os cromatogramas obtidos da análise de amostras de urina de dois pacientes, por ambas as metodologias.



**Figura 36.** Cromatogramas obtidos das amostras de urina dos pacientes 1 e 4 por: (A)-MEPS/UHPLC-PDA e (B) – QuEChERS/UHPLC-PDA.

Após a visualização cromatográfica, constatou-se que a forma e resolução dos picos de cada antidepressivo são muito semelhantes aos obtidos usando a amostra de urina branca fortificada. Além disso, não foi observada nenhuma interferência nos tempos de retenção dos analitos em estudo.

Relativamente à metodologia por MEPS/UHPLC-PDA, a gama de concentrações encontrada para as amostras de urina, provenientes de pacientes em tratamento com FLX, variou entre 0,18 e 1,73 µg/mL para o composto principal (FLX) e entre 0,14 e 1,71 µg/mL para o metabolito ativo, NORFLX. Para as amostras de urina provenientes de pacientes em tratamento com CLP, o intervalo de concentrações foi de 0,31 e 0,78 µg/mL para a CLP e para o metabolito ativo (DESCLP) foi de 0,25 e 0,55 µg/mL.

Quanto à metodologia por QuEChERS/UHPLC-PDA, as concentrações relativas às amostras com tratamento por FLX variaram entre 0,13 e 1,56 µg/mL para a FLX e entre 0,17 e 1,58 µg/mL para a NORFX, enquanto que para as amostras com tratamento por CLP as concentrações determinadas variaram entre 0,23 e 0,65 µg/mL para a CLP e entre 0,20 e 0,68 µg/mL para a DESCLP. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Unceta *et al.* (2008)<sup>[52]</sup> na aplicação da SPME/HPLC-DAD a amostras de urina de pacientes em tratamento com FLX.

Apesar do número reduzido de amostras, as concentrações urinárias determinadas sugerem que a concentração plasmática de *steady-state* foi atingida <sup>[52]</sup>. Contudo, mais estudos devem ser realizados para complementar os dados obtidos neste trabalho.



# CAPÍTULO VI

## **6. CONCLUSÕES**



## CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES

No decorrer deste trabalho, foram desenvolvidas duas metodologias analíticas baseadas na MEPS e no QuEChERS, seguidas de análise por UHPLC-PDA para a determinação dos antidepressivos fluoxetina, clomipramina e dos respetivos metabolitos ativos, norfluoxetina e desmetilclomipramina, em amostras de urina. O estudo dos metabolitos ativos deveu-se ao facto destes compostos exercerem potencial atividade farmacológica que, por sua vez, contribui para os efeitos gerados pelas substâncias que lhes dão origem.

Depois de uma seleção cuidadosa das condições cromatográficas, demonstrou-se que a separação dos antidepressivos e dos seus metabolitos poderá ser conseguida em menos de 10 minutos, com uma boa resolução cromatográfica. Além disso, a combinação do curto tempo de corrida com um fluxo da ordem dos  $\mu\text{L}$ , permitiu reduzir drasticamente o consumo de solventes tornando esta técnica não só mais económica, mas também amiga do ambiente. Por outro lado, a deteção por fotodiodos revelou ser uma alternativa económica, quando comparada com os equipamentos mais sofisticados e dispendiosos, como por exemplo o detetor de espectrometria de massa, tornando esta metodologia mais acessível a outros laboratórios.

No que respeita às técnicas de extração propriamente ditas, a MEPS e o QuEChERS foram as técnicas selecionadas para este estudo dada a sua versatilidade, simplicidade, rapidez e baixo custo, tornando-as atrativas do ponto de vista analítico, económico e ambiental. Após a otimização das diversas variáveis que afetam o desempenho de ambas as técnicas, a validação das duas metodologias analíticas foi avaliada em termos de seletividade, linearidade, limites de deteção e quantificação, precisão e exatidão.

Os resultados obtidos no estudo da validação dos métodos demonstraram ser adequados para a separação, identificação e quantificação da FLX, CLP e dos seus metabolitos ativos em amostras de urina. Os métodos demonstraram ser rápidos, seletivos e lineares na gama de concentrações de 0,1  $\mu\text{g/mL}$  a 5,0  $\mu\text{g/mL}$ . Os limites de deteção obtidos, iguais ou inferiores a 0,087  $\mu\text{g/mL}$  para a MEPS e 0,092  $\mu\text{g/mL}$  para o QuEChERS, possibilitaram a deteção destes compostos na urina em concentrações diminutas. Os ensaios validados provaram ainda ser precisos, exatos e reprodutíveis, tal como demonstrado nos resultados da análise estatística. Através do estudo dos 12 casos

reais apresentados, foi comprovada a aplicabilidade das duas metodologias analíticas descritas neste trabalho.

Estes resultados promissores sugerem que estas metodologias podem ser potencialmente úteis para quantificar cada uma destas substâncias, assim como outros fármacos, não só em amostras de urina, como também noutras matrizes, sendo uma alternativa às metodologias convencionais existentes. Importa referir que ambos os métodos analíticos apresentados podem ser melhorados em algumas vertentes, nomeadamente na otimização, de modo a aumentar a eficiência de extração.

De salientar que a simplicidade de ambas as metodologias propostas torna-as compatíveis com a rotina analítica de um laboratório de toxicologia. Neste sentido, os métodos aqui apresentados podem encontrar uma aplicabilidade relevante na prática clínica, especialmente na monitorização terapêutica e em cenários forenses, principalmente em casos de *overdose*.

# CAPÍTULO VII

## **7. BIBLIOGRAFIA**



**CAPÍTULO VII – BIBLIOGRAFIA**

1. Wang, X., *et al.*, *Pattern recognition approaches and computational systems tools for ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry-based comprehensive metabolomic profiling and pathways analysis of biological data sets*. *Anal Chem*, 2012. **84**(1): p. 428-39.
2. Bieniek, G., *Urinary excretion of phenols as an indicator of occupational exposure in the coke-plant industry*. *Int Arch Occup Environ Health*, 1997. **70**(5): p. 334-40.
3. World Health Organization. *Depression A Global Public Health Concern*. Disponível em: [http://www.who.int/mental\\_health/management/depression/who\\_paper\\_depression\\_wfmh\\_2012.pdf?ua=1](http://www.who.int/mental_health/management/depression/who_paper_depression_wfmh_2012.pdf?ua=1). Acedido a 06.10.2014.
4. Brunton, L.L., B.A. Chabner, B.C. Knollmann. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman*. 12ª ed. 2012, Brasil: McGraw Hill Brasil. 2112.
5. Filho, J.d.M. *Identidade Médica*. 2006, Brasil: Casa do Psicólogo. 392.
6. Ballone, G. J., Moura, E. C. *Tratamento da Depressão*. 2007. Disponível em: [www.psiqweb.med.br](http://www.psiqweb.med.br). Acedido a 16.10.2014.
7. Molina, M.R., *et al.*, *Prevalência de depressão em usuários de unidades de atenção primária*. *Revista de Psiquiatria Clínica*, 2012. **39**: p. 194-197.
8. Infarmed. *Evolução do Consumo de Antidepressivos em Portugal Continental de 1995 a 2001: Impacto das Medidas Reguladoras*. 2002. in Observatório do Medicamento e dos Produtos de Saúde. Infarmed.
9. Portal da Saúde. *Depressão*. 2006. Disponível em: <http://www.portaldasaude.pt/>. Acedido a 31.10.2014.
10. Swartz, K.L., M.D.S. Karen L., J.H. Medical. *Depression and Anxiety 2007*. 2007, Baltimore: Univ Health Pub. 77.
11. Wells, B., *et al.* *Pharmacotherapy Handbook, Seventh Edition*. 2008: Mcgraw-hill. 1072.
12. Nicholson, J.K.I.D. Wilson, *Opinion: understanding 'global' systems biology: metabonomics and the continuum of metabolism*. *Nat Rev Drug Discov*, 2003. **2**(8): p. 668-76.
13. Watkins, S.M.J.B. German, *Toward the implementation of metabolomic assessments of human health and nutrition*. *Curr Opin Biotechnol*, 2002. **13**(5): p. 512-6.
14. Zhang, A., *et al.*, *Future perspectives of personalized medicine in traditional Chinese medicine: a systems biology approach*. *Complement Ther Med*, 2012. **20**(1-2): p. 93-9.
15. Vincent, I.M., *et al.*, *Untargeted metabolomics reveals a lack of synergy between nifurtimox and eflornithine against Trypanosoma brucei*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012. **6**(5): p. 1618.
16. Bujak, R., *et al.*, *Metabolomics in urogenital cancer*. *Bioanalysis*, 2011. **3**(8): p. 913-23.
17. Dong, H., *et al.*, *Ingenuity pathways analysis of urine metabolomics phenotypes toxicity of Chuanwu in Wistar rats by UPLC-Q-TOF-HDMS coupled with pattern recognition methods*. *Mol Biosyst*, 2012. **8**(4): p. 1206-21.
18. Moreno, R.A., D.H. Moreno, M.B.d.M. Soares, *Psicofarmacologia de antidepressivos*. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 1999. **21**: p. 24-40.
19. Denkert, C., *et al.*, *Metabolomics of human breast cancer: new approaches for tumor typing and biomarker discovery*. *Genome Medicine*, 2012. **4**(4): p. 37.
20. Wang, X., *et al.*, *Potential drug targets on insomnia and intervention effects of Jujuboside A through metabolic pathway analysis as revealed by UPLC/ESI-SYNAPT-HDMS coupled with pattern recognition approach*. *J Proteomics*, 2012. **75**(4): p. 1411-27.
21. Núñez, C.M.A. Ortiz-Apodaca, *Excretion of free catecholamines by children*. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1994. **32**(6): p. 461-3.
22. Santiago, L.M., *et al.*, *O Medicamento, a Ansiedade e a Depressão*. *Acta Médica Portuguesa*, 2010. **23**: p. 983-992.

23. Furtado, Cláudia. *Psicofármacos: Evolução do consumo em Portugal Continental (2000 – 2012)*. 2013. Infarmed.
24. Paykel, E.S. *Handbook of Affective Disorders*. 2<sup>a</sup> ed. 1992, New York: The Guilford Press.
25. Stahl, S.M. *Psychopharmacology of Antidepressants*. 1997, London: Martin Dunitz.
26. Bauer, M., et al., *World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) Guidelines for biological treatment of unipolar depressive disorders, part 1: acute and continuation treatment of major depressive disorder*. *World Journal of Biological Psychiatry*, 2002. **3**(1): p. 5-43.
27. Bezchlibnyk-Butler, K.Z.J.J. Jeffries. *Clinical handbook of psychotropic drugs*. 9<sup>a</sup> ed. 1999, Seattle: Hogrefe & Huber.
28. Michael, J. and Burke, M.D. *Standard Antidepressant Pharmacotherapy for the Acute Treatment of Mood Disorders*. 2000. Disponível em: <http://www.acnp.org/g4/GN401000103/Default.htm>. Acedido a 10.12.2014.
29. Mourilhe, P.P. Stokes, *Risks and Benefits of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors in the Treatment of Depression*. *Drug Safety*, 1998. **18**(1): p. 57-82.
30. Fiedorowicz, J.G.K. L. Swartz, *The Role of Monoamine Oxidase Inhibitors in Current Psychiatric Practice*. *J Psychiatr Pract.*, 2004. **10**(4): p. 239-248.
31. Gahr, M., et al., *Intoxications with the monoamine oxidase inhibitor tranylcypromine: An analysis of fatal and non-fatal events*. *European Neuropsychopharmacology*, 2013. **23**(11): p. 1364-1372.
32. Infarmed. *Resumo das características do medicamento*. 2011. Disponível em: [http://www.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=51558&tipo\\_doc=rcm](http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=51558&tipo_doc=rcm). Acedido a 04.10.2014.
33. Tonelli, D.G.R. Andreatini, *Antagonistas 5-HT<sub>3</sub>: uma nova classe de ansiolíticos? O exemplo do ondansetron*. *Revista de Psiquiatria Clínica*, 2000. **27**(5): p. 272-279.
34. Infarmed. *Folheto informativo: Informação para o utilizador*. 2013. Disponível em: [http://www.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=44742&tipo\\_doc=fi](http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=44742&tipo_doc=fi). Acedido a 05.10.2014.
35. Silva, C.G.A.d.C.H. Collins, *Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes*. *Química Nova*, 2011. **34**: p. 665-676.
36. Baumann, P., et al., *The AGNP-TDM expert group consensus guidelines: therapeutic drug monitoring in psychiatry*. *Pharmacopsychiatry*, 2004. **37**(6): p. 243-65.
37. Jickells, S.A. Negrusz. *Clarke's Analytical Forensic Toxicology*. 1<sup>a</sup> ed. 2008, London: Pharmaceutical Press. 672.
38. Wong, D.T., K.W. Perry, F.P. Bymaster, *The Discovery of Fluoxetine Hydrochloride (Prozac)*. *Nat Rev Drug Discov*, 2005. **4**(9): p. 764-774.
39. Wong, D.T., F.P. Bymaster, E.A. Engleman, *Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication*. *Life Sci*, 1995. **57**(5): p. 411-41.
40. Carlsson, A.D.T. Wong, *A note on the discovery of selective serotonin reuptake inhibitors*. *Life Sciences*, 1997. **61**(12): p. 1203.
41. Ludwig, J., D.E. Marcotte, K. Norberg, *Anti-depressants and suicide*. *Journal of Health Economics*, 2009. **28**(3): p. 659-676.
42. MedlinePlus, *Fluoxetine*, 2014. Disponível em: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/meds/a689006.html>. Acedido a 05.01.2014.
43. Infarmed. *Folheto informativo: Informação para o utilizador*. 2011. Disponível em: [http://www.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=6162&tipo\\_doc=fi](http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=6162&tipo_doc=fi). Acedido a 15.11.2014.
44. Chow, T.W., et al., *A validated enantioselective assay for the simultaneous quantitation of (R)-, (S)-fluoxetine and (R)-, (S)-norfluoxetine in ovine plasma using liquid chromatography*

- with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS)*. Journal of Chromatography B, 2011. **879**(5–6): p. 349-358.
45. Whirl-Carrillo, M., *et al.*, *Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine*. Clin. Pharmacol. Ther., 2012. **92**(4): p. 414-417.
  46. Silva, B.J.G., F.M. Lanças, M.E.C. Queiroz, *Determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by polypyrrole-coated capillary in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-fluorescence detection*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(49): p. 8590-8597.
  47. Barclay, V.K.H., *et al.*, *Trace analysis of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. Part I: Development of a chiral liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for wastewater samples*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(33): p. 5587-5596.
  48. Ribeiro, A.R., *et al.*, *Enantioselective quantification of fluoxetine and norfluoxetine by HPLC in wastewater effluents*. Chemosphere, 2014. **95**(0): p. 589-596.
  49. Pubchem: Open Chemistry Database. Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Acedido a 05.03.2015.
  50. Telles-Correia, D., *et al.*, *Diferenças Farmacodinâmicas e Farmacocinéticas entre os SSRI: Implicações na Prática Clínica*. Acta Médica Portuguesa, 2007. **20**: p. 167-174.
  51. Rang, H.P., M.M. Dale, J.M. Ritter. *Other peripheral mediators: 5-hydroxytryptamine and purines*. 4ª ed. Pharmacology. 2001, Edinburgh: Harcourt Publishers Ltd.
  52. Unceta, N., *et al.*, *Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine and their main metabolites in human urine samples by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography*. J. Pharm. Biomed. Anal., 2008. **46**(4): p. 763-770.
  53. Altamura, A.C., A.R. Moro, M. Percudani, *Clinical pharmacokinetics of fluoxetine*. Clin Pharmacokinet, 1994. **26**(3): p. 201-14.
  54. Catterson, M.L.S.H. Preskorn, *Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors: clinical relevance*. Pharmacol Toxicol, 1996. **78**(4): p. 203-8.
  55. DrugBank. Disponível em: <http://www.drugbank.ca/>. Acedido a 11.03.2015.
  56. Harvey, A.T.S.H. Preskorn, *Cytochrome P450 Enzymes: Interpretation of Their Interactions With Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. Part I\*\**. Journal of Clinical Psychopharmacology, 1996. **16**(4): p. 273-285.
  57. Margolis, J.M., *et al.*, *(R)-, (S)-, and racemic fluoxetine N-demethylation by human cytochrome P450 enzymes*. Drug Metab Dispos, 2000. **28**(10): p. 1187-91.
  58. Ring, B.J., *et al.*, *Identification of the human cytochromes p450 responsible for in vitro formation of R- and S-norfluoxetine*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **297**(3): p. 1044-50.
  59. Gram, L.F., *Fluoxetine*. New England Journal of Medicine, 1994. **331**(20): p. 1354-1361.
  60. Hiemke, C.S. Härtter, *Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors*. Pharmacology & Therapeutics, 2000. **85**(1): p. 11-28.
  61. Medlineplus. 2012. Disponível em: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/007272.htm>. Acedido a 23.09.2014.
  62. Stein, D., B. Lerer, S. Stahl. *Essential Evidence-Based Psychopharmacology*. 2012, USA, Nova Iorque: Cambridge University Press. 325.
  63. Turner, S.M.L. Michelson. *Obsessive--Compulsive Disorder*. 1985, USA, Nova Iorque: Springer. 257.
  64. Pirola, R., *et al.*, *Simultaneous determination of clomipramine and its desmethyl and hydroxy metabolites in plasma of patients by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction*. J. Chromatogr. B, 2002. **772**(2): p. 205-210.
  65. Rang, H.P., M.M. Dale, J.M. Ritter. *Drugs used in affective disorders*. 4ª ed. Pharmacology. 2001, Edinburgh: Harcourt Publishers Ltd.

66. de Vos, A., J. van der Weide, H.M. Looovers, *Association between CYP2C19\*17 and metabolism of amitriptyline, citalopram and clomipramine in Dutch hospitalized patients.* Pharmacogenomics J., 2011. **11**(5): p. 359-67.
67. Balant-Gorgia, A.E., M. Gex-Fabry, L.P. Balant, *Clinical pharmacokinetics of clomipramine.* Clin. Pharmacokinet, 1991. **20**(6): p. 447-62.
68. Weigmann, H., *et al.*, *Steady state concentrations of clomipramine and its major metabolite desmethylclomipramine in rat brain and serum after oral administration of clomipramine.* Eur. Neuropsychopharmacol., 2000. **10**(5): p. 401-5.
69. Gex-Fabry, M., *et al.*, *Population pharmacokinetics of clomipramine, desmethylclomipramine, and hydroxylated metabolites in patients with depression receiving chronic treatment: model evaluation.* Ther. Drug Monit., 2000. **22**(6): p. 701-11.
70. Shimoda, K., *et al.*, *Metabolism of clomipramine in a Japanese psychiatric population: hydroxylation, desmethylation, and glucuronidation.* Neuropsychopharmacology, 1995. **12**(4): p. 323-33.
71. Uddin, M.N., V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis, *Bio-sample preparation and analytical methods for the determination of tricyclic antidepressants.* Bioanalysis, 2011. **3**(1): p. 97-118.
72. Romeiro, L.A.S., C.A.M. Fraga, E.J. Barreiro, *Novas estratégias terapêuticas para o tratamento da depressão: uma visão da química medicinal.* Química Nova, 2003. **26**: p. 347-358.
73. Bahls, S.-C., *Manual de farmacologia psiquiátrica de Kaplan e Sadock.* Revista Brasileira de Psiquiatria, 2002. **24**: p. 103-104.
74. Papoutsis, I., *et al.*, *A fully validated method for the simultaneous determination of 11 antidepressant drugs in whole blood by gas chromatography–mass spectrometry.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012. **70**(0): p. 557-562.
75. McBride, L.J. *Textbook of Urinalysis and Body Fluids: A Clinical Approach.* 1998, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
76. Evans, W.E., J.J. Schentag, W.J. Jusko. *Applied Pharmacokinetics – Principles of Therapeutic Drug Monitoring.* 3<sup>rd</sup> ed. 1992, Vancouver: Lippincott Williams & Wilkins.
77. Ryan, D., *et al.*, *Recent and potential developments in the analysis of urine: A review.* Analytica Chimica Acta, 2011. **684**(1–2): p. 17-29.
78. Saracino, M.A., *et al.*, *Multi-matrix assay of the first melatonergic antidepressant agomelatine by combined liquid chromatography-fluorimetric detection and microextraction by packed sorbent.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014. **95**(0): p. 61-67.
79. Simerville, J.A., W.C. Maxted, J.J. Pahira, *Urinalysis: a comprehensive review.* Am Fam Physician, 2005. **71**(6): p. 1153-62.
80. Olivieri, B.A.J. Rai, *A Primer on Clinical Applications and Assays Using Urine: Focus on Analysis of Plasma Cell Dyscrasias Using Automated Electrophoresis and Immunofixation*, in *The Urinary Proteome Methods and Protocols*, A.J. Rai, Editor. 2010, Humana Press: New York. p. 13.
81. Kemperman, R.F., *et al.*, *Comparative urine analysis by liquid chromatography-mass spectrometry and multivariate statistics: method development, evaluation, and application to proteinuria.* J Proteome Res, 2007. **6**(1): p. 194-206.
82. Habib, I.A. Malik. *The book of arabian medicine.* 2007, Beirut, Lebanon: Dar Ibn Hazm.
83. Fernández-Peralbo, M.A.M.D. Luque de Castro, *Preparation of urine samples prior to targeted or untargeted metabolomics mass-spectrometry analysis.* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2012. **41**(0): p. 75-85.
84. Brennan, L., *Session 2: Personalised nutrition. Metabolomic applications in nutritional research.* Proc Nutr Soc, 2008. **67**(4): p. 404-8.

85. Silva, C., *et al.*, *Microextraction by Packed Sorbent (MEPS) and Solid-Phase Microextraction (SPME) as Sample Preparation Procedures for the Metabolomic Profiling of Urine. Metabolites*, 2014. **4**(1): p. 71-97.
86. Tiller, J.W.G., *The new antidepressants*. Australian Prescriber, 1995. **18**(4): p. 92-96.
87. Oliveira, A.F.F., E.C. de Figueiredo, Á.J. dos Santos-Neto, *Analysis of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma by liquid-phase microextraction and injection port derivatization GC-MS*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013. **73**(0): p. 53-58.
88. Schulz, M., *et al.*, *Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics*. Critical Care, 2012. **16**(4): p. R136-R136.
89. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. 4ª ed, ed. A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop. 2011, USA: Pharmaceutical Press. 2100.
90. Bell, S. *Drugs, Poisons, and Chemistry*. 2009, United States of America: Facts On File. 124.
91. Rangel, R., *Noções Gerais Sobre Outras Ciências Forenses*. 2003, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto: Porto.
92. Calabuig, J.A.G.E.V. Cañadas. *Medicina Legal y Toxicología*. 6ª ed. 2004, Barcelona: Masson. 1394.
93. Karch, S.B. *Postmortem Toxicology of Abused Drugs*. 2008, New York: CRC Press. 216.
94. Boumba, V.A., K.S. Ziavrou, T. Vougiouklakis, *Hair as a Biological Indicator of Drug Use, Drug Abuse or Chronic Exposure to Environmental Toxicants*. International Journal of Toxicology, 2006. **25**: p. 143-163.
95. Levine, B. *Principles of Forensic Toxicology*. 2003, United States of America: AACC Press. 385.
96. Tanaka, E., *et al.*, *Forensic analysis of eleven cyclic antidepressants in human biological samples using a new reversed-phase chromatographic column of 2 microm porous microspherical silica gel*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1997. **692**(2): p. 405-12.
97. Nascimento, F.E. Mestrado em Química Forense: *Determinação da Amitriptilina e do seu metabolito Nortriptilina em sangue por GC/MS*. 2011. Universidade de Coimbra.
98. Pyell, U. *Electrokinetic Chromatography: Theory, Instrumentation and Applications*. 2007, Great Britain: Wiley. 552.
99. Shaw, L.M. *The Clinical Toxicology Laboratory: Contemporary Practice of Poisoning Evaluation*. 2001, United States of America: AACC Press. 537.
100. Favretto, D., *et al.*, *High performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and micropulverized extraction for the quantification of amphetamines, cocaine, opioids, benzodiazepines, antidepressants and hallucinogens in 2.5 mg hair samples*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(38): p. 6583-6595.
101. Saracino, M.A., *et al.*, *Multi-matrix assay of the first melatonergic antidepressant agomelatine by combined liquid chromatography-fluorimetric detection and microextraction by packed sorbent*. J. Pharm. Biomed. Anal., 2014. **95**(0): p. 61-67.
102. Tanaka, E., *et al.*, *Forensic analysis of eleven cyclic antidepressants in human biological samples using a new reversed-phase chromatographic column of 2 µm porous microspherical silica gel*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1997. **692**(2): p. 405-412.
103. Jones, G., *Postmortem toxicology*, in *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop, Editors. 2003, Pharmaceutical Press: London. p. 94-108.
104. Queiroz, S.C.N., C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, *Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica*. Química Nova, 2001. **24**: p. 68-76.
105. Moldoveanu, S.C.V. David. *Sample Preparation in Chromatography*. 2002, Netherlands: Elsevier Science. 942.

106. Pavlović, D.M., *et al.*, *Sample preparation in analysis of pharmaceuticals*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2007. **26**(11): p. 1062-1075.
107. Pereira, J., *et al.*, *Microextraction using packed sorbent as an effective and high-throughput sample extraction technique: Recent applications and future trends*. Sample Preparation, 2013. **1**: p. 38-53.
108. Xu, Q.A.T.L. Madden. *LC-MS in Drug Bioanalysis*. 2012, London: Springer.
109. Malfará, W.R., *et al.*, *Reliable HPLC method for therapeutic drug monitoring of frequently prescribed tricyclic and nontricyclic antidepressants*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007. **44**(4): p. 955-962.
110. Maurer, H.H.J. Bickeboeller-Friedrich, *Screening Procedure for Detection of Antidepressants of the Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Type and their Metabolites in Urine as Part of a Modified Systematic Toxicological Analysis Procedure using Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. Journal of Analytical Toxicology, 2000. **24**(5): p. 340-347.
111. Mercolini, L., *et al.*, *HPLC analysis of the novel antidepressant duloxetine in human plasma after an original solid-phase extraction procedure*. Journal of Chromatography B, 2007. **856**(1-2): p. 81-87.
112. Shinozuka, T., M. Terada, E. Tanaka, *Solid-phase extraction and analysis of 20 antidepressant drugs in human plasma by LC/MS with SSI method*. Forensic Science International, 2006. **162**(1-3): p. 108-112.
113. Nevado, J.J.B., *et al.*, *Screening of citalopram, fluoxetine and their metabolites in human urine samples by gas chromatography-mass spectrometry: A global robustness/ruggedness study*. Journal of Chromatography A, 2006. **1123**(1): p. 130-133.
114. Mastrogianni, O., *et al.*, *Determination of venlafaxine in post-mortem whole blood by HS-SPME and GC-NPD*. Forensic Science International, 2012. **215**(1-3): p. 105-9.
115. Chaves, A.R., *et al.*, *Microextraction in packed sorbent for analysis of antidepressants in human plasma by liquid chromatography and spectrophotometric detection*. J. Chromatogr. B, 2010. **878**(23): p. 2123-2129.
116. Woźniakiewicz, M., *et al.*, *Development of microextraction by packed sorbent for toxicological analysis of tricyclic antidepressant drugs in human oral fluid*. J. Chromatogr. A, 2014. **1337**(0): p. 9-16.
117. Peysson, W.E. Vulliet, *Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by analysis with liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2013. **1290**(0): p. 46-61.
118. Escada, M.S.d.S. Dissertação de Mestrado: *Métodos de análise de piperazinas em fluidos biológicos*. 2007. Departamento de Química, Universidade de Aveiro.
119. Pinto, M.M.M., *et al.* *Manual de Trabalhos Laboratoriais de Química Orgânica e Farmacêutica*. 2011, Lisboa: Lidel - Edições Técnicas Lda. . 462.
120. Agilent Technologies. *Sample Preparation Fundamentals For Chromatography*. Disponível em: [http://www.chem.agilent.com/Library/primers/Public/5991-3326EN\\_SPHB.pdf](http://www.chem.agilent.com/Library/primers/Public/5991-3326EN_SPHB.pdf). Acedido a 29.03.2015.
121. Castaing, N., *et al.*, *Quantification of Eight New Antidepressants and Five of their Active Metabolites in Whole Blood by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*. Journal of Analytical Toxicology, 2007. **31**(6): p. 334-341.
122. Esrafil, A., Y. Yamini, S. Shariati, *Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids*. Analytica Chimica Acta, 2007. **604**(2): p. 127-133.
123. Almeida, C., *et al.*, *Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica*. Química : Boletim da Sociedade Portuguesa de Química, 2004. **95**: p. 69-77.

124. Uges, D.R.A.J.M.H. Conemans, *Chapter 7 Antidepressants and antipsychotics*, in *Handbook of Analytical Separations*, M.J. Bogusz, Editor. 2008, Elsevier Science B.V. p. 287-317.
125. Żwir-Ferenc, A.M. Biziuk, *The Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications*. Polish Journal of Environmental Studies, 2006. **15**(5): p. 677-690.
126. Wille, S.M.R., *et al.*, *Development of a solid phase extraction for 13 ‘new’ generation antidepressants and their active metabolites for gas chromatographic–mass spectrometric analysis*. Journal of Chromatography A, 2005. **1098**(1–2): p. 19-29.
127. Wille, K., *et al.*, *Coupled chromatographic and mass-spectrometric techniques for the analysis of emerging pollutants in the aquatic environment*. Analytical Chemistry, 2012. **35**.
128. Thurman, E.M.M.S. Mills. *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*. 1998, New York: John Wiley & Sons, Inc.
129. Frit, J.S.M. Macka, *Solid-phase trapping of solutes for further chromatographic or electrophoretic analysis*. J Chromatogr A, 2000. **902**(1): p. 137-66.
130. Caldas, S.S., *et al.*, *Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas*. Química Nova, 2011. **34**: p. 1604-1617.
131. Araújo, R.M.d.S.C.G.d. Master: *Validação de metodologia de análise de pesticidas agrícolas em águas por LC/MS*. 2008. Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto.
132. Valente, I.M.A. PhD: *Desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação de off-flavours em bebidas*. 2014. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto.
133. Paíga, P., *et al.*, *Development of a SPE–UHPLC–MS/MS methodology for the determination of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in seawater*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2015. **106**(0): p. 61-70.
134. Wiese, S., *et al.*, *Coupling HPLC–SPE–NMR with a microplate-based high-resolution antioxidant assay for efficient analysis of antioxidants in food – Validation and proof-of-concept study with caper buds*. Food Chemistry, 2013. **141**(4): p. 4010-4018.
135. Hackett, J.A.A. Elian, *Extraction and analysis of flunitrazepam/7-aminoflunitrazepam in blood and urine by LC–PDA and GC–MS using butyl SPE columns*. Forensic Science International, 2006. **157**(2–3): p. 156-162.
136. Tadeo, J.L. *Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples*. 2008: CRC Press. 384.
137. Kataoka, H., *New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2003. **22**(4): p. 232-244.
138. Saar, E., *et al.*, *Comparison of extraction efficiencies and LC–MS–MS matrix effects using LLE and SPE methods for 19 antipsychotics in human blood*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. **393**(2): p. 727-734.
139. Abdel-Rehim, M., *New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications. I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2004. **801**(2): p. 317-21.
140. Moein, M.M., A. Abdel-Rehim, M. Abdel-Rehim, *Microextraction by packed sorbent (MEPS)*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2015. **67**(0): p. 34-44.
141. Queiroz, M.E.C., *Microextração em sorvente empacotado (MEPS) para a determinação de fármacos em fluidos biológicos*. Scientia Chromatographica, 2011. **3**(3): p. 223-229.
142. Abdel-Rehim, M., *Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(16): p. 2569-80.
143. Abdel-Rehim, M., *Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial*. Analytica Chimica Acta, 2011. **701**(2): p. 119-128.
144. Said, R., *et al.*, *Microextraction by packed sorbent for LC-MS/MS determination of drugs in whole blood samples*. Bioanalysis, 2010. **2**(2): p. 197-205.

145. Saracino, M.A., K. Tallarico, M.A. Raggi, *Liquid chromatographic analysis of oxcarbazepine and its metabolites in plasma and saliva after a novel microextraction by packed sorbent procedure*. Anal. Chim. Acta, 2010. **661**(2): p. 222-228.
146. Moreno, I.E.D., et al., *Determination of piperazine-type stimulants in human urine by means of microextraction in packed sorbent and high performance liquid chromatography-diode array detection*. J. Pharm. Biomed. Anal., 2012. **61**(0): p. 93-99.
147. Lafay, F., E. Vulliet, M.M. Flament-Waton, *Contribution of microextraction in packed sorbent for the analysis of cotinine in human urine by GC-MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. **396**(2): p. 937-41.
148. Gonçalves, J.L., et al., *A semi-automatic microextraction in packed sorbent, using a digitally controlled syringe, combined with ultra-high pressure liquid chromatography as a new and ultra-fast approach for the determination of prenylflavonoids in beers*. J. Chromatogr. A, 2013. **1304**(0): p. 42-51.
149. Noche, G.G., et al., *Microextraction by packed sorbent for the analysis of pharmaceutical residues in environmental water samples by in situ derivatization-programmed temperature vaporizer-gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(52): p. 9390-9396.
150. Prieto, A., S. Schrader, M. Moeder, *Determination of organic priority pollutants and emerging compounds in wastewater and snow samples using multiresidue protocols on the basis of microextraction by packed sorbents coupled to large volume injection gas chromatography-mass spectrometry analysis*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(38): p. 6002-6011.
151. Chaves, A.R., et al., *Microextraction in packed sorbent for analysis of antidepressants in human plasma by liquid chromatography and spectrophotometric detection*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010. **878**(23): p. 2123-9.
152. Rani, S., et al., *Quantification of Tricyclic and Nontricyclic Antidepressants in Spiked Plasma and Urine Samples Using Microextraction in Packed Syringe and Analysis by LC and GC-MS*. Chromatographia, 2011. **74**(3-4): p. 235-242.
153. Anastassiades, M., et al., *Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce*. J AOAC Int, 2003. **86**(2): p. 412-31.
154. Mosqueira, A.A.F.d.C.S. Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos: *Carbamato de Etilo em Vinhos Portugueses*. 2007. Faculdade de farmácia, Universidade de Lisboa.
155. Prestes, O.D., M.B. Adaime, R. Zanella, *QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos*. Scientia Chromatographica, 2011. **3**(1): p. 51-64.
156. Lucas, D., *The Applications of QuEChERS Beyond Fruits and Vegetables*. Chromatography Today, 2013. **6**(3): p. 14-16.
157. Phenomenex. *QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe)*. 2015. Disponível em: <http://www.phenomenex.com/>. Acedido a 16.05.2014.
158. Lehotay, S.J., et al., *Analysis of Pesticide Residues in Eggs by Direct Sample Introduction/Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(10): p. 4589-4596.
159. Lehotay, S.J., K. Mastovska, A.R. Lightfield, *Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables*. J AOAC Int, 2005. **88**(2): p. 615-29.
160. Prestes, O.D., et al., *QuEChERS - A modern sample preparation method for pesticide multiresidue determination in food by chromatographic methods coupled to mass spectrometry*. Química Nova, 2009. **32**(6).

161. Westland, J.L.F.L. Dorman, *QuEChERS extraction of benzodiazepines in biological matrices*. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2013. **3**(6): p. 509-517.
162. Beyer, A.M. Biziuk, *Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food*. Food Chemistry, 2008. **108**(2): p. 669-680.
163. Shimelis, O., et al., *Evaluation of a solid-phase extraction dual-layer carbon/primary secondary amine for clean-up of fatty acid matrix components from food extracts in multiresidue pesticide analysis*. J Chromatogr A, 2007. **1165**(1-2): p. 18-25.
164. Martinez Vidal, J.L., et al., *Validation of a gas chromatography/triple quadrupole mass spectrometry based method for the quantification of pesticides in food commodities*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006. **20**(3): p. 365-75.
165. Karageorgou, E.G.V.F. Samanidou, *Development and validation according to European Union Decision 2002/657/EC of an HPLC-DAD method for milk multi-residue analysis of penicillins and amphenicols based on dispersive extraction by QuEChERS in MSPD format*. J Sep Sci, 2011. **34**(15): p. 1893-901.
166. Plössl, F., M. Giera, F. Bracher, *Multiresidue analytical method using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry to determine pharmaceuticals in whole blood*. Journal of Chromatography A, 2006. **1135**(1): p. 19-26.
167. Martínez Vidal, J., et al., *Development of fast screening methods for the analysis of veterinary drug residues in milk by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. **397**(7): p. 2777-2790.
168. Stubbings, G.T. Bigwood, *The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) approach*. Analytica Chimica Acta, 2009. **637**(1-2): p. 68-78.
169. Anzillotti, L., S. Odoardi, S. Strano-Rossi, *Cleaning up blood samples using a modified "QuEChERS" procedure for the determination of drugs of abuse and benzodiazepines by UPLC-MSMS* ☆. Forensic Science International, 2014. **243**(0): p. 99-106.
170. Usui, K., et al., *Rapid drug extraction from human whole blood using a modified QuEChERS extraction method*. Legal Medicine, 2012. **14**(6): p. 286-296.
171. Simpson, C.F. *Practical High Performance Liquid Chromatography*. 1978, London: Heyden & Son.
172. Gomes, S.M.d.C. Mestrado em Química, ramo de Controlo de Qualidade e Ambiente: *Determinação de Antioxidantes por Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detecção Electroquímica*. 2010. Universidade de Coimbra.
173. Schwedt, G. *The Essential Guide to Analytical Chemistry*. 2ª ed. 1997, Chichester, England: John Wiley & Sons, Ltd. 260.
174. Maldaner, L.I.C.S.F. Jardim, *O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência*. Química Nova, 2009. **32**: p. 214-222.
175. Skoog, D.A., J. Holler, T. Nieman. *Princípios de Análise Instrumental*. 5ª ed. 2002, Porto Alegre: Bookman.
176. Araújo, J.M.A. *Química dos Alimentos: teoria e prática*. 3ª ed. 2004, Viçosa: Editora UFV. 416.
177. Cecchi, H.M. *Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos*. 2ª ed. 2003, Campinas: Editora da Unicamp. 207.
178. Harris, D.C. *Análise Química Quantitativa*. 6ª ed. 2005, Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. 876.
179. Pombeiro, A. *Técnicas e Operações Unitárias em Química Laboratorial*. 4ª ed. 2003, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1069.
180. Cass, Q.B.A.L.G. Degani. *Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação*. 2001, São Paulo: EdUFSCar. 77.

181. Raimundo Jr., I.M.C. Pasquini, *Espectrofotometria multicanal e arranjos de fotodiodos*. Química Nova, 1997. **20**: p. 83-88.
182. Waters. 2998 *Photodiode Array (PDA) Detector for Alliance HPLC Systems*. 2015. Disponível em: <https://www.waters.com/>. Acedido a 19.04.2015.
183. Maldaner, L.I.C.S.F. Jardim, *UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes*. Scientia Chromatographica, 2012. **4**(3): p. 197-207.
184. Waters. *Beginners Guide to UPLC*. 2015. Disponível em: [www.waters.com](http://www.waters.com). Acedido a 03.02.2015.
185. Jin, Y., et al., *HPLC and UPLC Switch for TCM analysis*. World Science and Technology, 2008. **10**(1): p. 80-84.
186. Pedraglio, S., et al., *New perspectives in bio-analytical techniques for preclinical characterization of a drug candidate: UPLC-MS/MS in in vitro metabolism and pharmacokinetic studies*. J Pharm Biomed Anal, 2007. **44**(3): p. 665-73.
187. Serrano, A., M. van Bommel, J. Hallett, *Evaluation between ultrahigh pressure liquid chromatography and high-performance liquid chromatography analytical methods for characterizing natural dyestuffs*. J Chromatogr A, 2013. **1318**: p. 102-11.
188. Nageswari, A., K.V. Reddy, K. Mukkanti, *Stability-indicating UPLC method for determination of Imatinib Mesylate and their degradation products in active pharmaceutical ingredient and pharmaceutical dosage forms*. J Pharm Biomed Anal, 2012. **66**: p. 109-15.
189. Nielsen, M.K.K., et al., *Simultaneous screening and quantification of 52 common pharmaceuticals and drugs of abuse in hair using UPLC–TOF-MS*. Forensic Science International, 2010. **196**(1–3): p. 85-92.
190. Lee, H.K., et al., *Development of a broad toxicological screening technique for urine using ultra-performance liquid chromatography and time-of-flight mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2009. **649**(1): p. 80-90.
191. Chambers, E.E., et al., *Systematic development of an UPLC–MS/MS method for the determination of tricyclic antidepressants in human urine*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014. **88**(0): p. 660-665.
192. Montesano, C., S.S. Johansen, M.K.K. Nielsen, *Validation of a method for the targeted analysis of 96 drugs in hair by UPLC–MS/MS*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014. **88**(0): p. 295-306.
193. Rosano, T.G., M. Wood, T.A. Swift, *Postmortem drug screening by non-targeted and targeted ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry technology*. J Anal Toxicol, 2011. **35**(7): p. 411-23.
194. Xiong, C., et al., *Extraction and determination of some psychotropic drugs in urine samples using dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009. **49**(2): p. 572-578.
195. Coulter, C., et al., *Antidepressant Drugs in Oral Fluid Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*. Journal of Analytical Toxicology, 2010. **34**(2): p. 64-72.
196. de Freitas, D.F., et al., *Three-phase, liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detection for the simultaneous determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010. **51**(1): p. 170-177.
197. Broecker, S., et al., *Combined use of liquid chromatography–hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC–QTOF-MS) and high performance liquid chromatography with photodiode array detector (HPLC–DAD) in systematic toxicological analysis*. Forensic Science International, 2011. **212**(1–3): p. 215-226.

198. Davarani, S.S.H., *et al.*, *Electromembrane extraction combined with gas chromatography for quantification of tricyclic antidepressants in human body fluids*. *Analytica Chimica Acta*, 2012. **725**(0): p. 51-56.
199. Bonde, S.L., *et al.*, *Simultaneous determination of Olanzapine and Fluoxetine in human plasma by LC–MS/MS: Its pharmacokinetic application*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014. **90**(0): p. 64-71.
200. Qiu, X., *et al.*, *An UPLC–MS/MS method for the analysis of glimepiride and fluoxetine in human plasma*. *Journal of Chromatography B*, 2015. **980**(0): p. 16-19.
201. Furtado, C., Ribeirinho, M., Gaspar, M. *Análise da Evolução da Utilização de Psicofármacos em Portugal Continental entre 2000 e 2009*. 2010. in Observatório do Medicamento e Produtos de Saúde Direcção de Economia do Medicamento e Produtos de Saúde. Infarmed.
202. Peters, F.T., O.H. Drummer, F. Musshoff, *Validation of new methods*. *Forensic Science International*, 2007. **165**(2–3): p. 216-224.
203. Poletini, A. *Applications of LC-MS in Toxicology*. 2006, London: Pharmaceutical Press. 275.
204. Relacre (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal). *Validação de métodos internos de ensaio em análise química— Guia Relacre nº 13*. 2000. Lisboa: Relacre.
205. Food and Drug Administration. *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*. Disponível em: <http://www.fda.gov>. Acedido a 12.05.2014.
206. International Conference on Harmonization. *Validation of analytical methods – Methodology ICH Q2*. Disponível em: <http://www.ich.org>. Acedido a 17.06.2014.
207. Ribani, M., *et al.*, *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*. *Química Nova*, 2004. **27**: p. 771-780.
208. Vessman, J., *et al.*, *Selectivity in analytical chemistry (IUPAC recommendations 2001)*. *Pure and Applied Chemistry*, 2001. **73**(8): p. 1381-1386.
209. Fernandes, S.C.S. Dissertação de Mestrado: *Determinação de Sertralina, Venlafaxina e seus Metabólitos Activos, em Sangue e Urina, por UPLC-MS/MS*. 2013. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.
210. Chiaradia, M.C. Tese de Doutoramento: *Desenvolvimento, Validação e Aplicação de Métodos para Análise Multiresidual de Agrotóxicos em suco de laranja e tangerina utilizando CLAE-DAD, CL-EM-EM e CLUE-DAD*. 2009. Departamento de Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.
211. Marcos, M. Mestrado em Química Forense: *Determinação de Medicamentos Antiepilépticos e Anticonvulsivantes por UPLC-MS/MS*. 2011. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.
212. Thompson, M., S. L. R. Ellison, R. Wood, *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report)*. *Pure and Applied Chemistry*, 2002. **74**(5): p. 835-855.
213. Cuadros-Rodríguez, L., *et al.*, *Calibration in chemical measurement processes. II. A methodological approach*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2001. **20**(11): p. 620-636.
214. Cass, Q.B., *et al.*, *Determination of amoxicillin in human plasma by direct injection and coupled-column high-performance liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 2003. **987**(1–2): p. 235-241.
215. Cass, Q.B.T. Ferreira Galatti, *A method for determination of the plasma levels of modafinil enantiomers, (±)-modafinil acid and modafinil sulphone by direct human plasma injection and bidimensional achiral–chiral chromatography*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008. **46**(5): p. 937-944.
216. Ligiero, C.B.P., *et al.*, *Comparação entre métodos de quantificação em cromatografia gasosa: um experimento para cursos de química*. *Química Nova*, 2009. **32**: p. 1338-1341.

217. Hassan, A., *Simultaneous Determination of Selective Drugs, Fluoxetine, Ketoprofen, Oxybutynin and Clonidine in Human Plasma*. Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011. **4**(2).
218. Vecchione, G., *et al.*, *A reliable and rapid tool for plasma quantification of 18 psychotropic drugs by ESI tandem mass spectrometry*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012. **67–68**(0): p. 104-113.
219. Gibb, I., Sprake, Ed, Preece, S. *A Validated UPLC<sup>TM</sup>/MS/MS Method for Risperidone and 9-Hydroxyrisperidone in Human Plasma*. 2005. Waters Corporation. USA.
220. International Organization for Standardization. *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions*. ISO 5725-1. 1994. Genève.
221. Gonçalves, M.E.P., *et al.*, *Validação do método de determinação simultânea dos íons brometo e bromato por cromatografia iônica em águas de consumo humano*. Química Nova, 2004. **27**: p. 503-507.
222. International Organization for Standardization. *ISO 8466–1 – Water Quality – Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics – Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function*. 1990. Genève.
223. International Organization for Standardization. *ISO 8466–2 – Water Quality – Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics – Part 2: Calibration strategy for non linear calibration functions*. 1993. Genève.
224. Barreira, M.J.M.M. *Mestrado de Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos: Ocorrência de patulina em alimentos destinados a lactentes e crianças: optimização e validação do método de análise por SPE-HPLC-UV*. 2009. Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa.
225. Cassiano, N.M., *et al.*, *Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas*. Química Nova, 2009. **32**: p. 1021-1030.
226. Peters, F.T.H.H. Maurer, *Bioanalytical method validation - How, how much and why? Department of Experimental and Clinical Toxicology*. Institute of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, University of Saarland.
227. Maroto, A., *et al.*, *Estimation of measurement uncertainty by using regression techniques and spiked samples*. Analytica Chimica Acta, 2001. **446**(1–2): p. 131-143.
228. Maroto, A., *et al.*, *Estimating uncertainties of analytical results using information from the validation process*. Analytica Chimica Acta, 1999. **391**(2): p. 173-185.
229. Nascimento, F. *Dissertação de Mestrado: Determinação da Amitriptilina e do seu metabolito Nortriptilina em sangue por GC/MS*. 2011. Universidade de Coimbra.
230. J. Barwick, V.S. L. R. Ellison, *Measurement uncertainty: Approaches to the evaluation of uncertainties associated with recovery[dagger]*. Analyst, 1999. **124**(7): p. 981-990.
231. Maroto, A., *et al.*, *Measurement uncertainty in analytical methods in which trueness is assessed from recovery assays*. Analytica Chimica Acta, 2001. **440**(2): p. 171-184.
232. Zrostlikova, J., *et al.*, *Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices*. J Chromatogr A, 2001. **937**(1-2): p. 73-86.
233. Lambert, W., *Pitfalls in LC-MS(-MS) Analysis*. Toxichem und Krimtech, 2004. **71**(2).
234. Waters. *HSS (High Strength Silica)Technology*. Disponível em: <http://www.waters.com>. Acedido a 25.03.2014.
235. Mandrioli, R., *et al.*, *Analysis of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma, urine and saliva by MEPS-LC-UV*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011. **879**(2): p. 167-73.
236. Mercolini, L., *et al.*, *A fast and feasible microextraction by packed sorbent (MEPS) procedure for HPLC analysis of the atypical antipsychotic ziprasidone in human plasma*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014. **88**(0): p. 467-471.

237. Barattini, V., *et al.*, *Separation of phospho and glyco peptides using porous graphitic carbon for the proteomic study of oncology patients*. 2010, Thermo Scientific.
238. Neue, U., *HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice*. 1997, Wiley-VCH, New York.
239. Silva, C.R., *et al.*, *Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência*. *Química Nova*, 2004. **27**: p. 270-276.
240. Salvador, A.J.L.M. Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas: *Efeito do substituinte "-F" nas propriedades electrónicas e estruturais das fluoroquinolonas de 3ª e 4ª gerações*. 2012. Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa.
241. Remer, T., G. Montenegro-Bethancourt, L. Shi, *Long-term urine biobanking: Storage stability of clinical chemical parameters under moderate freezing conditions without use of preservatives*. *Clinical Biochemistry*, 2014. **47**(18): p. 307-311.
242. Palego, L., *et al.*, *Simultaneous analysis of clozapine, clomipramine and their metabolites by reversed-phase liquid chromatography*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2001. **25**(3): p. 519-33.
243. de Souza, I.D., D.S. Domingues, M.E.C. Queiroz, *Hybrid silica monolith for microextraction by packed sorbent to determine drugs from plasma samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. *Talanta*, 2015. **140**(0): p. 166-175.
244. Waters. *QuEChERS procedure for multi-residue pesticide analysis*. 2011. Disponível em: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003643en.pdf>. Acedido a 18.05.2015
245. Anastassiades, M., *et al.*, *Recent Developments in QuEChERS Methodology for Pesticide Multiresidue Analysis*, in *Pesticide Chemistry*. 2007, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 439-458.



# CAPÍTULO VIII

## **8. ANEXOS**



## CAPÍTULO VIII- ANEXOS

### ANEXO 1 – Formulário de recolha das amostras de urina de pacientes.

			
---	---	--	---

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE NOVAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

Formulário para recolha de amostras biológicas (urina) de pacientes internados na Casa de Saúde S. João de Deus do Funchal, cujo tratamento clínico implique a administração de Antidepressivos, nomeadamente Fluoxetina e Clomipramina.

Data da colheita: \_\_ / \_\_ / \_\_\_\_

Instituição: Casa de Saúde S. João de Deus do Funchal	Nº amostra:
Idade: _____ anos	Sexo: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>
Há quanto tempo o paciente encontra-se em tratamento?	
Qual a medicação habitualmente administrada?	
Qual a via de administração da medicação?	
Tempo decorrido desde a administração da última dose?	
Observações:	

Volume de amostra de urina: \_\_\_\_\_ mL

.....  
Assinatura do Técnico de Saúde

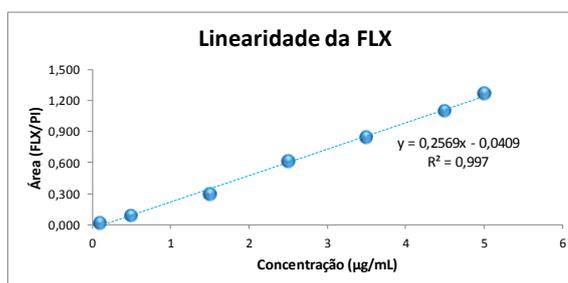
**ANEXO 2 – Estudo Estatístico da Linearidade por MEPS/UHPLC-PDA.**

**Resultados estatísticos da Linearidade para a fluoxetina**

Concentração (µg/mL)	Área FLX	Área PI	Área (FLX/PI)
0,1	4698	262790	0,018
0,5	23199	270070	0,086
1,5	83032	277454	0,299
2,5	159935	261076	0,613
3,5	219870	259881	0,846
4,5	267796	242861	1,103
5,0	319940	251726	1,271

**RESUMO DOS RESULTADOS**

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998516232
R-Quadrado	0,997034666
R-quadrado ajustado	0,9964416
Erro padrão	0,029395757
Observações	7



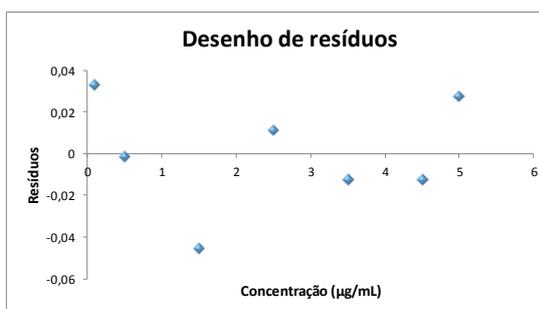
**ANOVA**

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,452700166	1,452700166	1681,150884	1,62751E-07
Resíduo	5	0,004320553	0,000864111		
Total	6	1,457020718			

	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores
Interseção	-0,040913977	0,019278153	-2,122297581	0,08725121	-0,0905	0,0086
Concentração (µg/mL)	0,256916541	0,006265976	41,00184001	1,62751E-07	0,2408	0,2730

**RESULTADOS DE RESÍDUOS**

Observação	Previsto(a) Areas (Y)	Resíduos
1	-0,015222323	0,033099114
2	0,087544294	-0,001643181
3	0,344460835	-0,045197413
4	0,601377376	0,011219658
5	0,858293917	-0,012252249
6	1,115210458	-0,012542341
7	1,243668728	0,027316412

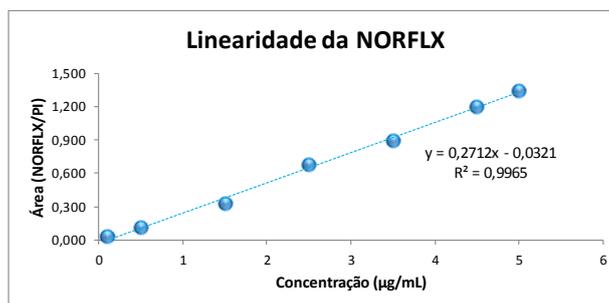


## Resultados estatísticos da Linearidade para a norfluoxetina

Concentração (µg/mL)	Área NORFLX	Área PI	Área (NORFLX/PI)
0,1	5921	262865	0,023
0,5	28678	270109	0,106
1,5	89639	277495	0,323
2,5	176760	261100	0,677
3,5	230198	259915	0,886
4,5	289861	242852	1,194
5,0	334482	249606	1,340

### RESUMO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998251182
R-Quadrado	0,996505422
R-quadrado ajustado	0,995806507
Erro padrão	0,033693169
Observações	7



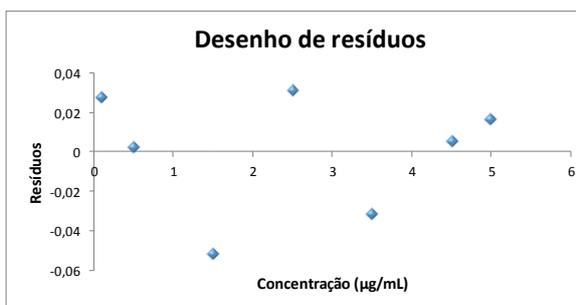
### ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,61859674	1,618596737	1425,787971	2,45419E-07
Resíduo	5	0,00567615	0,00113523		
Total	6	1,62427289			

	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores
Interseção	-0,032137071	0,02209646	-1,454399338	0,205586084	-0,0889	0,0247
Concentração (µg/mL)	0,271189833	0,00718201	37,75960766	2,45419E-07	0,2527	0,2897

### RESULTADOS DE RESÍDUOS

Observação	Previsto(a) Areas (Y)	Resíduos
1	-0,005018088	0,02754293
2	0,103457845	0,00271281
3	0,374647678	-0,05161796
4	0,645837511	0,03114592
5	0,917027344	-0,03136381
6	1,188217177	0,00535158
7	1,323812093	0,01622853

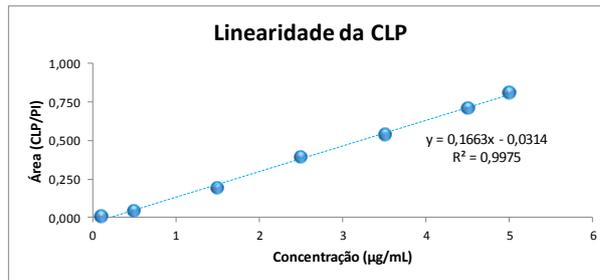


## Resultados estatísticos da Linearidade para a clomipramina

Concentração (µg/mL)	Área CLP	Área PI	Área (CLP/PI)
0,1	2308	262790	0,009
0,5	11153	270045	0,041
1,5	54418	277384	0,196
2,5	103040	261078	0,395
3,5	140350	259889	0,540
4,5	173143	242857	0,713
5,0	202582	249151	0,813

### RESUMO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998732308
R-Quadrado	0,997466223
R-quadrado ajustado	0,996959467
Erro padrão	0,017585267
Observações	7



### ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	0,608692087	0,608692087	1968,33824	1,09823E-07
Resíduo	5	0,001546208	0,000309242		
Total	6	0,610238295			

	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores
Interseção	-0,031421186	0,011532666	-2,724537787	0,041549671	-0,0611	-0,0018
Concentração (µg/mL)	0,166304079	0,003748461	44,36595812	1,09823E-07	0,1567	0,1759

### RESULTADOS DE RESÍDUOS

Observação	Previsto(a) Areas (Y)	Resíduos
1	-0,014790778	0,023573465
2	0,051730854	-0,010431606
3	0,218034933	-0,021853559
4	0,384339012	0,010332864
5	0,550643091	-0,010605871
6	0,71694717	-0,004007302
7	0,800099209	0,012992009

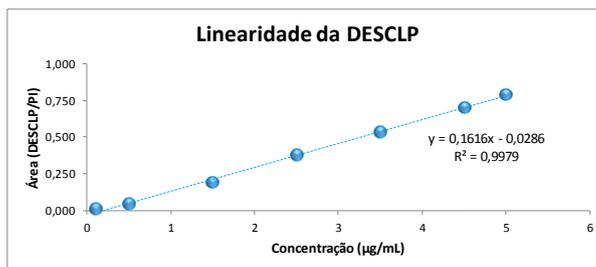


### Resultados estatísticos da Linearidade para a desmetilclomipramina

Concentração (µg/mL)	Área DESCLP	Área PI	Área (DESCLP/PI)
0,1	2916	262891	0,011
0,5	12203	270180	0,045
1,5	52892	277497	0,191
2,5	98102	261102	0,376
3,5	138873	259775	0,535
4,5	169869	242845	0,699
5,0	193738	245949	0,788

#### RESUMO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998943381
R-Quadrado	0,997887878
R-quadrado ajustado	0,997465454
Erro padrão	0,015602315
Observações	7



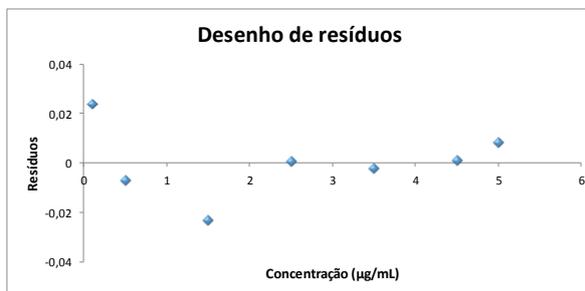
#### ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	0,575056901	0,575056901	2362,287425	6,96633E-08
Resíduo	5	0,001217161	0,000243432		
Total	6	0,576274063			

	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores
Interseção	-0,028649889	0,010232219	-2,799968394	0,03799504	-0,0550	-0,0023
Concentração (µg/mL)	0,161643961	0,003325777	48,60336846	6,96633E-08	0,1531	0,1702

#### RESULTADOS DE RESÍDUOS

Observação	Previsto(a) Areas (Y)	Resíduos
1	-0,012485493	0,023576255
2	0,052172092	-0,007007141
3	0,213816052	-0,023213768
4	0,375460013	0,000261656
5	0,537103974	-0,002515121
6	0,698747934	0,000750428
7	0,779569915	0,008147691



## ANEXO 3 – Estudo Estatístico da Precisão Intermédia por MEPS/UHPLC-PDA.

Tabela 37. Resultados estatísticos da precisão intermédia para a fluoxetina.

Data	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
$R^2$	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999
Declive	0,2098	0,2206	0,2230	0,2223	0,2082
$Y_0$	0,0073	-0,0032	-0,0022	0,0001	-0,0022
<b>Gama Baixa 0,1 µg/mL</b>					
Replicado 1	0,106	0,108	0,105	0,087	0,097
Replicado 2	0,1076	0,093	0,11	0,091	0,103
Replicado 3	0,118	0,095	0,098	0,079	0,108
Média	0,111	0,099	0,104	0,086	0,103
Recuperação (%)	111,3	98,6	104,5	85,8	103,1
Concentração Média	0,107				
Recuperação Média (%)	100,7				
Repetibilidade ( $S_r$ )	0,007				
Between Run ( $S_{run}$ )	0,008				
Precisão Intermédia	0,122				
CV (%)	9,4				
<b>Gama Baixa 2,5 µg/mL</b>					
Replicado 1	2,484	2,493	2,496	2,546	2,498
Replicado 2	2,479	2,506	2,504	2,516	2,487
Replicado 3	2,472	2,51	2,474	2,521	2,496
Média	2,478	2,503	2,491	2,528	2,494
Recuperação (%)	99,1	100,1	99,6	101,1	99,8
Concentração Média	2,499				
Recuperação Média (%)	99,9				
Repetibilidade ( $S_r$ )	0,011				
Between Run ( $S_{run}$ )	0,017				
Precisão Intermédia	0,169				
CV (%)	0,74				
<b>Gama Baixa 5,0 µg/mL</b>					
Replicado 1	5,014	4,995	5,015	4,982	4,993
Replicado 2	5,011	5,016	5,005	4,996	5,019
Replicado 3	5,008	4,986	4,993	4,979	4,997
Média	5,011	4,999	5,004	4,986	5,003
Recuperação (%)	100,2	100,0	100,1	99,7	100,1
Concentração Média	5,001				
Recuperação Média (%)	100,0				
Repetibilidade ( $S_r$ )	0,011				
Between Run ( $S_{run}$ )	0,007				
Precisão Intermédia	0,135				
CV (%)	0,18				

**Tabela 38.** Resultados estatísticos da precisão intermédia para a norfluoxetina.

Data	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
$R^2$	0,9999	0,9998	0,9999	0,9999	0,9999
Declive	0,1952	0,1961	0,1960	0,2123	0,2047
$Y_0$	0,0343	0,0284	0,0342	0,0299	0,0324
<b>Gama Baixa 0,1 µg/mL</b>					
Replicado 1	0,095	0,112	0,095	0,110	0,103
Replicado 2	0,094	0,121	0,104	0,115	0,113
Replicado 3	0,098	0,118	0,108	0,113	0,106
Média	0,096	0,117	0,102	0,113	0,107
Recuperação (%)	96,4	117,0	101,5	112,9	107,5
Concentração Média	0,107				
Recuperação Média (%)	107,1				
Repetibilidade ( $S_r$ )	0,005				
<i>Between Run</i> ( $S_{run}$ )	0,008				
Precisão Intermédia	0,112				
CV (%)	7,8				
<b>Gama Baixa 2,5 µg/mL</b>					
Replicado 1	2,48	2,548	2,503	2,472	2,495
Replicado 2	2,522	2,549	2,496	2,479	2,478
Replicado 3	2,52	2,555	2,491	2,473	2,483
Média	2,507	2,466	2,497	2,475	2,485
Recuperação (%)	100,3	98,6	99,9	99,0	99,4
Concentração Média	2,486				
Recuperação Média (%)	99,4				
Repetibilidade ( $S_r$ )	0,012				
<i>Between Run</i> ( $S_{run}$ )	0,029				
Precisão Intermédia	0,201				
CV (%)	0,66				
<b>Gama Baixa 5,0 µg/mL</b>					
Replicado 1	5,01	4,948	5,007	5,006	5,012
Replicado 2	5,003	5,002	4,996	5,021	5,010
Replicado 3	4,979	4,975	5,001	5,009	4,998
Média	4,997	5,017	5,001	5,012	5,007
Recuperação (%)	99,9	100,3	100,0	100,2	100,1
Concentração Média	5,007				
Recuperação Média (%)	100,1				
Repetibilidade ( $S_r$ )	0,015				
<i>Between Run</i> ( $S_{run}$ )	0,011				
Precisão Intermédia	0,162				
CV (%)	0,16				

**Tabela 39.** Resultados estatísticos da precisão intermédia para a clomipramina.

Data	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
$R^2$	0,9999	0,9998	0,9999	0,9999	0,9999
Declive	0,1496	0,1517	0,1462	0,1300	0,1329
$Y_0$	-0,0041	-0,0071	-0,0056	-0,0006	-0,0013
<b>Gama Baixa 0,1 µg/mL</b>					
Replicado 1	0,102	0,123	0,113	0,124	0,101
Replicado 2	0,091	0,111	0,103	0,101	0,104
Replicado 3	0,093	0,108	0,104	0,106	0,109
Média	0,095	0,114	0,107	0,110	0,105
Recuperação (%)	95,4	113,6	107,3	110,4	104,5
Concentração Média	0,106				
Recuperação Média (%)	106,2				
Repetibilidade ( $S_r$ )	0,008				
Between Run ( $S_{run}$ )	0,006				
Precisão Intermédia	0,115				
CV (%)	6,6				
<b>Gama Baixa 2,5 µg/mL</b>					
Replicado 1	2,521	2,481	2,489	2,486	2,472
Replicado 2	2,499	2,471	2,496	2,479	2,494
Replicado 3	2,512	2,467	2,473	2,475	2,506
Média	2,509	2,473	2,486	2,480	2,491
Recuperação (%)	100,4	98,9	99,4	99,2	99,6
Concentração Média	2,488				
Recuperação Média (%)	99,5				
Repetibilidade ( $S_r$ )	0,011				
Between Run ( $S_{run}$ )	0,013				
Precisão Intermédia	0,155				
CV (%)	0,55				
<b>Gama Baixa 5,0 µg/mL</b>					
Replicado 1	4,985	5,009	5,014	5,007	5,002
Replicado 2	5,003	5,027	5,002	5,013	5,007
Replicado 3	5,001	5,004	5,006	5,011	5,003
Média	4,996	5,013	5,007	5,010	5,004
Recuperação (%)	99,9	100,3	100,1	100,2	100,1
Concentração Média	5,006				
Recuperação Média (%)	100,1				
Repetibilidade ( $S_r$ )	0,008				
Between Run ( $S_{run}$ )	0,005				
Precisão Intermédia	0,112				
CV (%)	0,13				

**Tabela 40.** Resultados estatísticos da precisão intermédia para a desmetilclomipramina.

Data	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
$R^2$	0,9997	0,9999	0,9998	0,9999	0,9999
Declive	0,1321	0,1261	0,1361	0,1120	0,1147
$Y_0$	-0,0020	0,0045	-0,0032	0,0031	0,0010
<b>Gama Baixa 0,1 µg/mL</b>					
Replicado 1	0,085	0,094	0,101	0,103	0,105
Replicado 2	0,102	0,103	0,112	0,109	0,121
Replicado 3	0,092	0,096	0,105	0,113	0,107
Média	0,093	0,098	0,106	0,108	0,111
Recuperação (%)	93,4	98,1	105,7	107,5	110,9
Concentração Média	0,103				
Recuperação Média (%)	103,1				
Repetibilidade ( $S_r$ )	0,007				
Between Run ( $S_{run}$ )	0,006				
Precisão Intermédia	0,115				
CV (%)	7,0				
<b>Gama Baixa 2,5 µg/mL</b>					
Replicado 1	2,498	2,515	2,479	2,493	2,482
Replicado 2	2,523	2,494	2,495	2,475	2,479
Replicado 3	2,519	2,504	2,492	2,487	2,476
Média	2,513	2,504	2,489	2,485	2,479
Recuperação (%)	100,5	100,1	99,6	99,4	99,1
Concentração Média	2,494				
Recuperação Média (%)	99,8				
Repetibilidade ( $S_r$ )	0,010				
Between Run ( $S_{run}$ )	0,013				
Precisão Intermédia	0,151				
CV (%)	0,56				
<b>Gama Baixa 5,0 µg/mL</b>					
Replicado 1	5,006	4,989	5,001	5,008	5,003
Replicado 2	4,993	5,008	5,005	5,003	5,019
Replicado 3	4,982	4,996	5,010	5,011	5,008
Média	4,994	4,998	5,005	5,007	5,010
Recuperação (%)	99,9	100,0	100,1	100,1	100,2
Concentração Média	5,003				
Recuperação Média (%)	100,1				
Repetibilidade ( $S_r$ )	0,008				
Between Run ( $S_{run}$ )	0,005				
Precisão Intermédia	0,115				
CV (%)	0,14				

## ANEXO 4 – Estudo Estatístico da Exatidão por MEPS/UHPLC-PDA.

Tabela 41. Resultados estatísticos da exatidão para a fluoxetina.

Data	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
Equação da reta	$y=0,2098x + 0,0073$	$y=0,22206x - 0,0032$	$y=0,2230x - 0,0022$	$y=0,2223x + 0,0001$	$y=0,2082x - 0,0022$
<b>Gama Baixa 0,1 µg/mL</b>					
Média	0,111	0,099	0,104	0,086	0,103
Recuperação (%)	111,3	98,6	104,5	85,8	103,1
Recuperação Média (%)	100,7				
Desvio padrão	9,45				
CV (%)	9,4				
N (nº dias)	5				
T <sub>exp</sub>	0,15				
T <sub>crit</sub>	2,78				
Incerteza de R%	4,2				
Incerteza padrão rel.	0,042				
<b>Gama Baixa 2,5 µg/mL</b>					
Média	2,478	2,503	2,491	2,528	2,494
Recuperação (%)	99,1	100,1	99,6	101,1	99,8
Recuperação Média (%)	99,9				
Desvio padrão	0,74				
CV (%)	0,7				
N (nº dias)	5				
T <sub>exp</sub>	0,15				
T <sub>crit</sub>	2,78				
Incerteza de R%	0,33				
Incerteza padrão rel.	0,003				
<b>Gama Baixa 5,0 µg/mL</b>					
Média	5,011	4,999	5,004	4,986	5,003
Recuperação (%)	100,2	100,0	100,1	99,7	100,1
Recuperação Média (%)	100,0				
Desvio padrão	0,18				
CV (%)	0,2				
N (nº dias)	5				
T <sub>exp</sub>	0,15				
T <sub>crit</sub>	2,78				
Incerteza de R%	0,08				
Incerteza padrão rel.	0,001				

**Tabela 42.** Resultados estatísticos da exatidão para a norfluoxetina.

Data	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
<b>Equação da reta</b>	$y=0,1952x + 0,0343$	$y=0,1961x + 0,0284$	$y=0,1960x + 0,0342$	$y=0,2123x + 0,0299$	$y=0,2047x + 0,0324$
<b>Gama Baixa 0,1 µg/mL</b>					
<b>Média</b>	0,096	0,117	0,102	0,113	0,107
<b>Recuperação (%)</b>	96,4	117,0	101,5	112,9	107,5
<b>Recuperação Média (%)</b>	107,1				
<b>Desvio padrão</b>	8,32				
<b>CV (%)</b>	7,8				
<b>N (nº dias)</b>	5				
<b>T<sub>exp</sub></b>	1,90				
<b>T<sub>crit</sub></b>	2,78				
<b>Incerteza de R%</b>	3,7				
<b>Incerteza padrão rel.</b>	0,037				
<b>Gama Baixa 2,5 µg/mL</b>					
<b>Média</b>	2,507	2,466	2,497	2,475	2,485
<b>Recuperação (%)</b>	100,3	98,6	99,9	99,0	99,4
<b>Recuperação Média (%)</b>	99,4				
<b>Desvio padrão</b>	0,66				
<b>CV (%)</b>	0,7				
<b>N (nº dias)</b>	5				
<b>T<sub>exp</sub></b>	1,89				
<b>T<sub>crit</sub></b>	2,78				
<b>Incerteza de R%</b>	0,3				
<b>Incerteza padrão rel.</b>	0,003				
<b>Gama Baixa 5,0 µg/mL</b>					
<b>Média</b>	4,997	5,017	5,001	5,012	5,007
<b>Recuperação (%)</b>	99,9	100,3	100,0	100,2	100,1
<b>Recuperação Média (%)</b>	100,1				
<b>Desvio padrão</b>	0,16				
<b>CV (%)</b>	0,2				
<b>N (nº dias)</b>	5				
<b>T<sub>exp</sub></b>	1,88				
<b>T<sub>crit</sub></b>	2,78				
<b>Incerteza de R%</b>	0,1				
<b>Incerteza padrão rel.</b>	0,001				

**Tabela 43.** Resultados estatísticos da exatidão para a clomipramina.

Data	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
<b>Equação da reta</b>	$y=0,1496x - 0,0041$	$y=0,1517x - 0,0071$	$y=0,1462x - 0,0056$	$y=0,1300x - 0,0006$	$y=0,1329x - 0,0013$
<b>Gama Baixa 0,1 µg/mL</b>					
<b>Média</b>	0,095	0,114	0,107	0,110	0,105
<b>Recuperação (%)</b>	95,4	113,6	107,3	110,4	104,5
<b>Recuperação Média (%)</b>	106,2				
<b>Desvio padrão</b>	6,96				
<b>CV (%)</b>	6,6				
<b>N (nº dias)</b>	5				
<b>T<sub>exp</sub></b>	2,01				
<b>T<sub>crit</sub></b>	2,78				
<b>Incerteza de R%</b>	3,1				
<b>Incerteza padrão rel.</b>	0,031				
<b>Gama Baixa 2,5 µg/mL</b>					
<b>Média</b>	2,509	2,473	2,486	2,480	2,491
<b>Recuperação (%)</b>	100,4	98,9	99,4	99,2	99,6
<b>Recuperação Média (%)</b>	99,5				
<b>Desvio padrão</b>	0,55				
<b>CV (%)</b>	0,5				
<b>N (nº dias)</b>	5				
<b>T<sub>exp</sub></b>	2,01				
<b>T<sub>crit</sub></b>	2,78				
<b>Incerteza de R%</b>	0,2				
<b>Incerteza padrão rel.</b>	0,002				
<b>Gama Baixa 5,0 µg/mL</b>					
<b>Média</b>	4,996	5,013	5,007	5,010	5,004
<b>Recuperação (%)</b>	99,9	100,3	100,1	100,2	100,1
<b>Recuperação Média (%)</b>	100,1				
<b>Desvio padrão</b>	0,13				
<b>CV (%)</b>	0,1				
<b>N (nº dias)</b>	5				
<b>T<sub>exp</sub></b>	2,01				
<b>T<sub>crit</sub></b>	2,78				
<b>Incerteza de R%</b>	0,1				
<b>Incerteza padrão rel.</b>	0,001				

**Tabela 44.** Resultados estatísticos da exatidão para a desmetilclomipramina.

Data	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
<b>Equação da reta</b>	$y=0,1321x - 0,0020$	$y=0,1261x + 0,0045$	$y=0,1361x - 0,0032$	$y=0,1120x + 0,0031$	$y=0,1147x + 0,0010$
<b>Gama Baixa 0,1 µg/mL</b>					
Média	0,093	0,098	0,106	0,108	0,111
Recuperação (%)	93,4	98,1	105,7	107,5	110,9
Recuperação Média (%)	103,1				
Desvio padrão	7,17				
CV (%)	7,0				
N (nº dias)	5				
T <sub>exp</sub>	0,98				
T <sub>crit</sub>	2,78				
Incerteza de R%	3,2				
Incerteza padrão rel.	0,032				
<b>Gama Baixa 2,5 µg/mL</b>					
Média	2,513	2,504	2,489	2,485	2,479
Recuperação (%)	100,5	100,1	99,6	99,4	99,1
Recuperação Média (%)	99,8				
Desvio padrão	0,56				
CV (%)	0,6				
N (nº dias)	5				
T <sub>exp</sub>	0,98				
T <sub>crit</sub>	2,78				
Incerteza de R%	0,25				
Incerteza padrão rel.	0,003				
<b>Gama Baixa 5,0 µg/mL</b>					
Média	4,994	4,998	5,005	5,007	5,010
Recuperação (%)	99,9	100,0	100,1	100,1	100,2
Recuperação Média (%)	100,1				
Desvio padrão	0,14				
CV (%)	0,1				
N (nº dias)	5				
T <sub>exp</sub>	0,98				
T <sub>crit</sub>	2,78				
Incerteza de R%	0,06				
Incerteza padrão rel.	0,001				

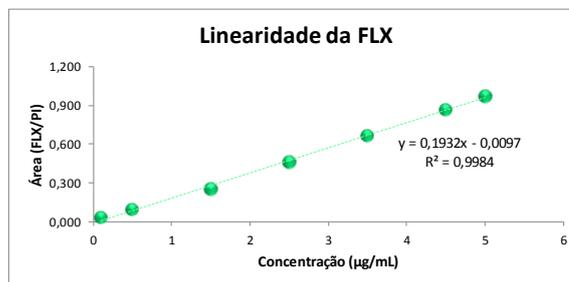
**ANEXO 5 – Estudo Estatístico da Linearidade por QuEChERS/UHPLC-PDA.**

**Resultados estatísticos da Linearidade para a fluoxetina**

Concentração (µg/mL)	Área FLX	Área PI	Área (FLX/PI)
0,1	12777	458862	0,028
0,5	38453	410614	0,094
1,5	120008	474976	0,253
2,5	213023	461706	0,461
3,5	332764	497341	0,669
4,5	460957	533813	0,864
5,0	506122	525070	0,964

**RESUMO DOS RESULTADOS**

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999178055
R-Quadrado	0,998356787
R-quadrado ajustado	0,998028144
Erro padrão	0,01644248
Observações	7



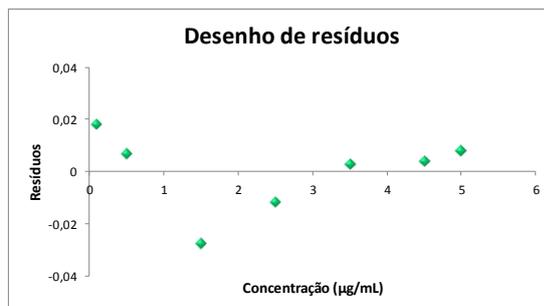
**ANOVA**

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	0,821289803	0,821289803	3037,818398	3,71851E-08
Resíduo	5	0,001351776	0,000270355		
Total	6	0,822641579			

	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores
Interseção	-0,00969038	0,01078321	-0,89865448	0,410022689	-0,0374	0,0180
Concentração (µg/mL)	0,193175608	0,003504866	55,1164077	3,71851E-08	0,1842	0,2022

**RESULTADOS DE RESÍDUOS**

Observação	Previsto(a) Areas (Y)	Resíduos
1	0,00962718	0,018218545
2	0,086897424	0,006750955
3	0,280073032	-0,027410885
4	0,473248641	-0,011865297
5	0,666424249	0,002661353
6	0,859599857	0,00391828
7	0,956187661	0,007727049

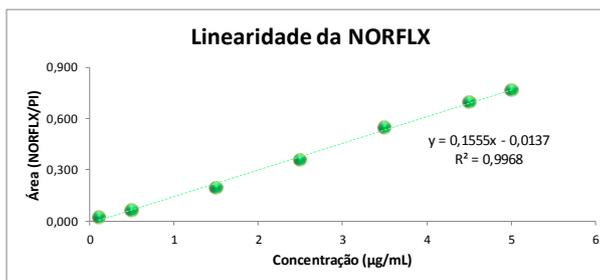


### Resultados estatísticos da Linearidade para a norfluoxetina

Concentração (µg/mL)	Área NORFLX	Área PI	Área (NORFLX/PI)
0,1	10630	458862	0,023
0,5	26827	410633	0,065
1,5	92745	474902	0,195
2,5	163823	461716	0,355
3,5	271476	497345	0,546
4,5	369453	533806	0,692
5,0	401670	525077	0,765

#### RESUMO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998383041
R-Quadrado	0,996768697
R-quadrado ajustado	0,996122437
Erro padrão	0,018579999
Observações	7



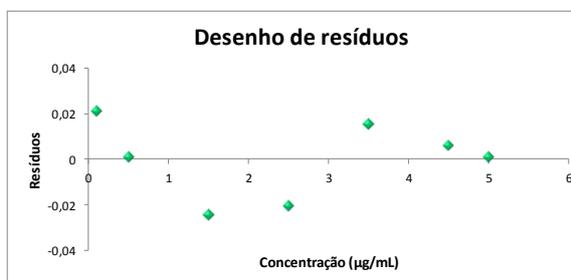
#### ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	0,53244915	0,532449152	1542,364	2,02E-07
Resíduo	5	0,00172608	0,000345216		
Total	6	0,53417523			

	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores
Interseção	-0,013710352	0,01218503	-1,12518038	0,311605	-0,0450	0,0176
Concentração (x)	0,155540376	0,0039605	39,27293752	2,02E-07	0,1454	0,1657

#### RESULTADOS DE RESÍDUOS

Observação	Prevista(a) Areas (Y)	Resíduos
1	0,001843686	0,02132226
2	0,064059836	0,00127021
3	0,219600211	-0,02430705
4	0,375140587	-0,02032789
5	0,530680962	0,01516956
6	0,686221338	0,00589003
7	0,763991526	0,00098287

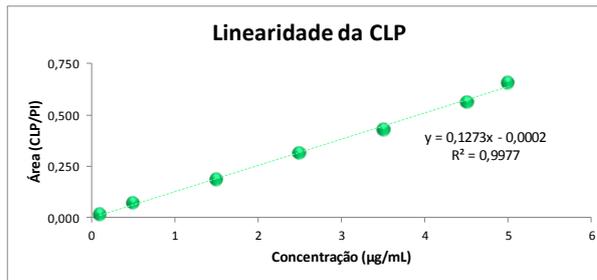


## Resultados estatísticos da Linearidade para a clomipramina

Concentração (µg/mL)	Área CLP	Área PI	Área (CLP/PI)
0,1	7415	458857	0,016
0,5	29048	410631	0,071
1,5	88541	474932	0,186
2,5	145140	461710	0,314
3,5	214607	497390	0,431
4,5	300589	533811	0,563
5,0	345206	525042	0,657

### RESUMO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998837607
R-Quadrado	0,997676565
R-quadrado ajustado	0,997211878
Erro padrão	0,012893281
Observações	7



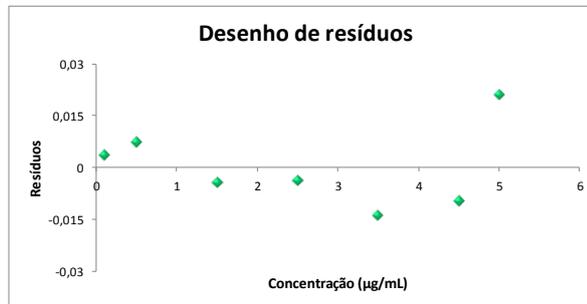
### ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	0,356907923	0,356907923	2146,98637	8,84231E-08
Resíduo	5	0,000831183	0,000166237		
Total	6	0,357739107			

	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores
Interseção	-0,000220563	0,008455596	-0,026084849	0,980198728	-0,0220	0,0215
Concentração (µg/mL)	0,127345079	0,002748321	46,33558427	8,84231E-08	0,1203	0,1344

### RESULTADOS DE RESÍDUOS

Observação	Previsto(a) Areas (Y)	Resíduos
1	0,012513945	0,003645791
2	0,063451977	0,007287146
3	0,190797056	-0,004367401
4	0,318142135	-0,003789082
5	0,445487214	-0,014021085
6	0,572832293	-0,009732588
7	0,636504833	0,02097722

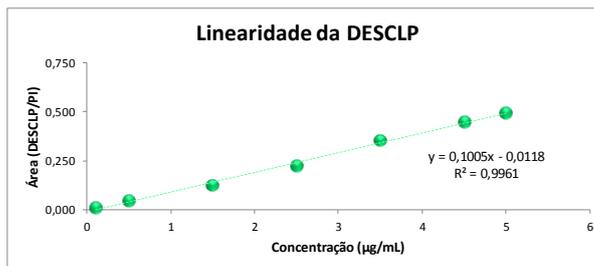


## Resultados estatísticos da Linearidade para a desmetilclomipramina

Concentração (µg/mL)	Área DESCLP	Área PI	Área (DESCLP/PI)
0,1	4201	458863	0,009
0,5	17368	410600	0,042
1,5	59212	474833	0,125
2,5	102582	461703	0,222
3,5	176231	497384	0,354
4,5	237397	533777	0,445
5,0	257134	525057	0,490

### RESUMO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998071334
R-Quadrado	0,996146388
R-quadrado ajustado	0,995375666
Erro padrão	0,013119753
Observações	7



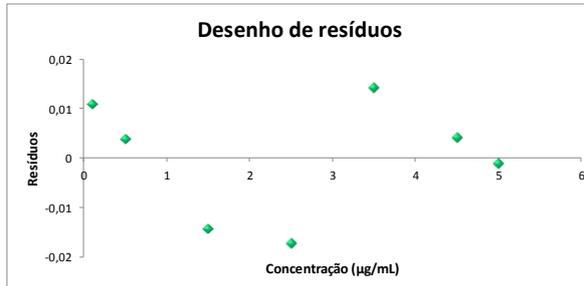
### ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	0,222472583	0,222472583	1292,484078	3,13435E-07
Resíduo	5	0,00086064	0,000172128		
Total	6	0,223333222			

	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores
Interseção	-0,011769986	0,008604119	-1,367947782	0,229602077	-0,0339	0,0103
Concentração (µg/mL)	0,100540797	0,002796596	35,95113458	3,13435E-07	0,0934	0,1077

### RESULTADOS DE RESÍDUOS

Observação	Previsto(a) Areas (Y)	Resíduos
1	-0,001715906	0,010870413
2	0,038500413	0,003799485
3	0,139041209	-0,014341236
4	0,239582006	-0,017400351
5	0,340122802	0,014192932
6	0,440663599	0,004086205
7	0,490933997	-0,001207447



## ANEXO 6 – Estudo Estatístico da Precisão Intermédia por QuEChERS/UHPLC-PDA.

Tabela 45. Resultados estatísticos da precisão intermédia para a fluoxetina.

Data	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
$R^2$	0,9997	0,9998	0,9999	0,9999	0,9995
Declive	0,1928	0,1920	0,1857	0,1865	0,1846
$Y_0$	0,0114	0,0108	0,0102	0,0067	0,0070
<b>Gama Baixa 0,1 µg/mL</b>					
Replicado 1	0,077	0,108	0,105	0,096	0,092
Replicado 2	0,083	0,083	0,110	0,108	0,103
Replicado 3	0,093	0,092	0,098	0,087	0,075
Média	0,084	0,094	0,104	0,097	0,090
Recuperação (%)	83,6	94,1	104,3	96,8	89,7
Concentração Média	0,094				
Recuperação Média (%)	93,7				
Repetibilidade ( $S_r$ )	0,011				
Between Run ( $S_{run}$ )	0,004				
Precisão Intermédia	0,122				
CV (%)	8,3				
<b>Gama Baixa 2,5 µg/mL</b>					
Replicado 1	2,494	2,493	2,496	2,487	2,498
Replicado 2	2,542	2,529	2,506	2,514	2,535
Replicado 3	2,559	2,514	2,474	2,518	2,527
Média	2,532	2,512	2,492	2,506	2,520
Recuperação (%)	101,3	100,5	99,7	100,2	100,8
Concentração Média	2,512				
Recuperação Média (%)	100,5				
Repetibilidade ( $S_r$ )	0,022				
Between Run ( $S_{run}$ )	0,008				
Precisão Intermédia	0,172				
CV (%)	0,6				
<b>Gama Baixa 5,0 µg/mL</b>					
Replicado 1	5,011	4,984	5,015	4,982	4,993
Replicado 2	4,968	5,012	5,005	4,996	5,012
Replicado 3	4,974	4,986	4,993	5,013	4,965
Média	4,984	4,994	5,004	4,997	4,990
Recuperação (%)	99,7	99,9	100,1	99,9	99,8
Concentração Média	4,994				
Recuperação Média (%)	99,9				
Repetibilidade ( $S_r$ )	0,018				
Between Run ( $S_{run}$ )	0,008				
Precisão Intermédia	0,161				
CV (%)	0,1				

**Tabela 46.** Resultados estatísticos da precisão intermédia para a norfluoxetina.

Data	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
$R^2$	0,9997	0,9996	0,9994	0,9999	0,9999
Declive	0,1503	0,1566	0,1548	0,1513	0,1498
$Y_0$	0,0101	0,0063	0,0046	0,0071	0,0138
<b>Gama Baixa 0,1 µg/mL</b>					
Replicado 1	0,107	0,112	0,103	0,087	0,095
Replicado 2	0,113	0,102	0,112	0,105	0,089
Replicado 3	0,104	0,114	0,118	0,093	0,079
Média	0,108	0,109	0,111	0,095	0,088
Recuperação (%)	108,1	109,2	110,9	94,6	88,2
Concentração Média	0,102				
Recuperação Média (%)	102,2				
Repetibilidade ( $S_r$ )	0,007				
<i>Between Run</i> ( $S_{run}$ )	0,009				
Precisão Intermédia	0,129				
CV (%)	9,9				
<b>Gama Baixa 2,5 µg/mL</b>					
Replicado 1	2,483	2,468	2,487	2,528	2,563
Replicado 2	2,492	2,480	2,478	2,519	2,526
Replicado 3	2,476	2,498	2,471	2,486	2,481
Média	2,484	2,482	2,479	2,511	2,523
Recuperação (%)	99,4	99,3	99,1	100,4	100,9
Concentração Média	2,496				
Recuperação Média (%)	99,8				
Repetibilidade ( $S_r$ )	0,023				
<i>Between Run</i> ( $S_{run}$ )	0,015				
Precisão Intermédia	0,195				
CV (%)	0,8				
<b>Gama Baixa 5,0 µg/mL</b>					
Replicado 1	5,015	4,987	5,007	4,962	4,991
Replicado 2	5,011	5,011	4,996	5,016	4,996
Replicado 3	4,997	5,028	5,027	5,008	4,979
Média	5,008	5,009	5,010	4,995	4,989
Recuperação (%)	100,2	100,2	100,2	99,9	99,8
Concentração Média	5,002				
Recuperação Média (%)	100,0				
Repetibilidade ( $S_r$ )	0,018				
<i>Between Run</i> ( $S_{run}$ )	0,005				
Precisão Intermédia	0,152				
CV (%)	0,2				

**Tabela 47.** Resultados estatísticos da precisão intermédia para a clomipramina.

Data	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
$R^2$	0,9994	0,9995	0,9996	0,9994	0,9999
Declive	0,1254	0,1281	0,1287	0,1298	0,1314
$Y_0$	0,0020	0,0079	0,0043	0,0052	0,0031
<b>Gama Baixa 0,1 µg/mL</b>					
Replicado 1	0,125	0,087	0,115	0,097	0,087
Replicado 2	0,098	0,096	0,108	0,087	0,104
Replicado 3	0,107	0,091	0,104	0,083	0,095
Média	0,110	0,091	0,109	0,089	0,095
Recuperação (%)	110,2	90,6	109,0	89,4	95,5
Concentração Média	0,099				
Recuperação Média (%)	98,9				
Repetibilidade ( $S_r$ )	0,009				
Between Run ( $S_{run}$ )	0,009				
Precisão Intermédia	0,131				
CV (%)	10,1				
<b>Gama Baixa 2,5 µg/mL</b>					
Replicado 1	2,473	2,511	2,481	2,521	2,519
Replicado 2	2,487	2,527	2,496	2,512	2,494
Replicado 3	2,481	2,517	2,47	2,531	2,514
Média	2,480	2,518	2,482	2,521	2,509
Recuperação (%)	99,2	100,7	99,3	100,8	100,4
Concentração Média	2,502				
Recuperação Média (%)	100,1				
Repetibilidade ( $S_r$ )	0,010				
Between Run ( $S_{run}$ )	0,019				
Precisão Intermédia	0,171				
CV (%)	0,8				
<b>Gama Baixa 5,0 µg/mL</b>					
Replicado 1	4,985	4,976	5,017	4,982	4,983
Replicado 2	5,013	5,027	4,998	5,013	5,016
Replicado 3	5,031	4,969	5,012	4,974	4,988
Média	5,010	4,991	5,009	4,990	4,996
Recuperação (%)	100,2	99,8	100,2	99,8	99,9
Concentração Média	4,999				
Recuperação Média (%)	100,0				
Repetibilidade ( $S_r$ )	0,022				
Between Run ( $S_{run}$ )	0,008				
Precisão Intermédia	0,172				
CV (%)	0,2				

**Tabela 48.** Resultados estatísticos da precisão intermédia para a desmetilclomipramina.

Data	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
$R^2$	0,9999	0,9999	0,9998	0,9999	0,9999
Declive	0,0970	0,0990	0,1017	0,0978	0,0972
$Y_0$	0,0015	0,0004	-0,0006	0,0016	0,0009
<b>Gama Baixa 0,1 µg/mL</b>					
Replicado 1	0,088	0,097	0,101	0,098	0,105
Replicado 2	0,109	0,115	0,112	0,105	0,113
Replicado 3	0,097	0,096	0,105	0,085	0,092
Média	0,098	0,103	0,106	0,096	0,103
Recuperação (%)	98,1	102,7	106,4	96,1	102,8
Concentração Média	0,101				
Recuperação Média (%)	101,2				
Repetibilidade ( $S_r$ )	0,010				
Between Run ( $S_{run}$ )	0,004				
Precisão Intermédia	0,116				
CV (%)	4,1				
<b>Gama Baixa 2,5 µg/mL</b>					
Replicado 1	2,486	2,515	2,479	2,493	2,485
Replicado 2	2,509	2,494	2,492	2,522	2,503
Replicado 3	2,517	2,477	2,489	2,508	2,496
Média	2,504	2,495	2,487	2,508	2,495
Recuperação (%)	100,2	99,8	99,5	100,3	99,8
Concentração Média	2,498				
Recuperação Média (%)	99,9				
Repetibilidade ( $S_r$ )	0,014				
Between Run ( $S_{run}$ )	0,002				
Precisão Intermédia	0,127				
CV (%)	0,3				
<b>Gama Baixa 5,0 µg/mL</b>					
Replicado 1	5,008	4,989	5,002	4,995	4,987
Replicado 2	4,995	5,014	5,005	4,983	5,014
Replicado 3	4,992	5,006	5,011	5,011	5,008
Média	4,998	5,003	5,006	4,996	5,003
Recuperação (%)	100,0	100,1	100,1	99,9	100,1
Concentração Média	5,001				
Recuperação Média (%)	100,0				
Repetibilidade ( $S_r$ )	0,011				
Between Run ( $S_{run}$ )	0,005				
Precisão Intermédia	0,129				
CV (%)	0,1				

## ANEXO 7 – Estudo Estatístico da Exatidão por QuEChERS/UHPLC-PDA.

Tabela 49. Resultados estatísticos da exatidão para a fluoxetina.

Data	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
Equação da reta	$y=0,1928x + 0,0114$	$y=0,1920x + 0,0108$	$y=0,1857x + 0,0102$	$y=0,1865x + 0,0067$	$y=0,1846x + 0,0070$
<b>Gama Baixa 0,1 µg/mL</b>					
Média	0,084	0,094	0,104	0,097	0,090
Recuperação (%)	83,6	94,1	104,3	96,8	89,7
Recuperação Média (%)	93,7				
Desvio padrão	7,73				
CV (%)	8,3				
N (nº dias)	5				
T <sub>exp</sub>	1,82				
T <sub>crit</sub>	2,78				
Incerteza de R%	3,5				
Incerteza padrão rel.	0,035				
<b>Gama Baixa 2,5 µg/mL</b>					
Média	2,532	2,512	2,492	2,506	2,520
Recuperação (%)	101,3	100,5	99,7	100,2	100,8
Recuperação Média (%)	100,5				
Desvio padrão	0,61				
CV (%)	0,6				
N (nº dias)	5				
T <sub>exp</sub>	1,82				
T <sub>crit</sub>	2,78				
Incerteza de R%	0,27				
Incerteza padrão rel.	0,003				
<b>Gama Baixa 5,0 µg/mL</b>					
Média	4,984	4,994	5,004	4,997	4,990
Recuperação (%)	99,7	99,9	100,1	99,9	99,8
Recuperação Média (%)	99,9				
Desvio padrão	0,15				
CV (%)	0,1				
N (nº dias)	5				
T <sub>exp</sub>	1,82				
T <sub>crit</sub>	2,78				
Incerteza de R%	0,07				
Incerteza padrão rel.	0,001				

**Tabela 50.** Resultados estatísticos da exatidão para a norfluoxetina.

Data	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
<b>Equação da reta</b>	$y=0,1503x + 0,0101$	$y=0,1566x + 0,0063$	$y=0,1548x + 0,0046$	$y=0,1513x + 0,0071$	$y=0,1498x + 0,0138$
<b>Gama Baixa 0,1 µg/mL</b>					
Média	0,108	0,109	0,111	0,095	0,088
Recuperação (%)	108,1	109,2	110,9	94,6	88,2
Recuperação Média (%)	102,2				
Desvio padrão	10,15				
CV (%)	9,9				
N (nº dias)	5				
T <sub>exp</sub>	0,48				
T <sub>crit</sub>	2,78				
Incerteza de R%	4,5				
Incerteza padrão rel.	0,045				
<b>Gama Baixa 2,5 µg/mL</b>					
Média	2,484	2,482	2,479	2,511	2,523
Recuperação (%)	99,4	99,3	99,1	100,4	100,9
Recuperação Média (%)	99,8				
Desvio padrão	0,80				
CV (%)	0,8				
N (nº dias)	5				
T <sub>exp</sub>	0,48				
T <sub>crit</sub>	2,78				
Incerteza de R%	0,4				
Incerteza padrão rel.	0,004				
<b>Gama Baixa 5,0 µg/mL</b>					
Média	5,008	5,009	5,010	4,995	4,989
Recuperação (%)	100,2	100,2	100,2	99,9	99,8
Recuperação Média (%)	100,0				
Desvio padrão	0,19				
CV (%)	0,2				
N (nº dias)	5				
T <sub>exp</sub>	0,48				
T <sub>crit</sub>	2,78				
Incerteza de R%	0,1				
Incerteza padrão rel.	0,001				

**Tabela 51.** Resultados estatísticos da exatidão para a clomipramina.

Data	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
Equação da reta	$y=0,1254x + 0,0020$	$y=0,1281x + 0,0079$	$y=0,1287x + 0,0043$	$y=0,1298x + 0,0052$	$y=0,1314x + 0,0031$
<b>Gama Baixa 0,1 µg/mL</b>					
Média	0,110	0,091	0,109	0,089	0,095
Recuperação (%)	110,2	90,6	109,0	89,4	95,5
Recuperação Média (%)	98,9				
Desvio padrão	10,01				
CV (%)	10,1				
N (nº dias)	5				
T <sub>exp</sub>	0,24				
T <sub>crit</sub>	2,78				
Incerteza de R%	4,5				
Incerteza padrão rel.	0,045				
<b>Gama Baixa 2,5 µg/mL</b>					
Média	2,480	2,518	2,482	2,521	2,509
Recuperação (%)	99,2	100,7	99,3	100,8	100,4
Recuperação Média (%)	100,1				
Desvio padrão	0,78				
CV (%)	0,8				
N (nº dias)	5				
T <sub>exp</sub>	0,24				
T <sub>crit</sub>	2,78				
Incerteza de R%	0,4				
Incerteza padrão rel.	0,004				
<b>Gama Baixa 5,0 µg/mL</b>					
Média	5,010	4,991	5,009	4,990	4,996
Recuperação (%)	100,2	99,8	100,2	99,8	99,9
Recuperação Média (%)	100,0				
Desvio padrão	0,19				
CV (%)	0,2				
N (nº dias)	5				
T <sub>exp</sub>	0,24				
T <sub>crit</sub>	2,78				
Incerteza de R%	0,1				
Incerteza padrão rel.	0,001				

**Tabela 52.** Resultados estatísticos da exatidão para a desmetilclomipramina.

Data	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
<b>Equação da reta</b>	$y=0,0970x + 0,0015$	$y=0,0990x + 0,0004$	$y=0,1017x - 0,0006$	$y=0,0978x + 0,0016$	$y=0,0972x + 0,0009$
<b>Gama Baixa 0,1 µg/mL</b>					
<b>Média</b>	0,098	0,103	0,106	0,096	0,103
<b>Recuperação (%)</b>	98,1	102,7	106,4	96,1	102,8
<b>Recuperação Média (%)</b>	101,2				
<b>Desvio padrão</b>	4,11				
<b>CV (%)</b>	4,1				
<b>N (nº dias)</b>	5				
<b>T<sub>exp</sub></b>	0,66				
<b>T<sub>crit</sub></b>	2,78				
<b>Incerteza de R%</b>	1,8				
<b>Incerteza padrão rel.</b>	0,018				
<b>Gama Baixa 2,5 µg/mL</b>					
<b>Média</b>	2,504	2,495	2,487	2,508	2,495
<b>Recuperação (%)</b>	100,2	99,8	99,5	100,3	99,8
<b>Recuperação Média (%)</b>	99,9				
<b>Desvio padrão</b>	0,32				
<b>CV (%)</b>	0,3				
<b>N (nº dias)</b>	5				
<b>T<sub>exp</sub></b>	0,66				
<b>T<sub>crit</sub></b>	2,78				
<b>Incerteza de R%</b>	0,14				
<b>Incerteza padrão rel.</b>	0,001				
<b>Gama Baixa 5,0 µg/mL</b>					
<b>Média</b>	4,998	5,003	5,006	4,996	5,003
<b>Recuperação (%)</b>	100,0	100,1	100,1	99,9	100,1
<b>Recuperação Média (%)</b>	100,0				
<b>Desvio padrão</b>	0,08				
<b>CV (%)</b>	0,1				
<b>N (nº dias)</b>	5				
<b>T<sub>exp</sub></b>	0,66				
<b>T<sub>crit</sub></b>	2,78				
<b>Incerteza de R%</b>	0,04				
<b>Incerteza padrão rel.</b>	0,0004				

