

Dried Saliva Spots: Avaliação da estabilidade de antipsicóticos em amostras de fluido oral

Carina Donzelo Gameiro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2^o ciclo de estudos)

Orientadora: Mestre Joana Domingos Gonçalves
Co-orientador: Mestre Tiago Alexandre Pires Rosado
Co-orientadora: Professora Doutora Maria Eugenia Gallardo Alba

Setembro de 2020

Dedicatória

Esta dissertação é dedicada aos meus pais, ao meu irmão e aos meus avós.

Agradecimentos

Esta dissertação é o resultado obtido através de muito trabalho, luta e dedicação ao longo de todo o meu percurso académico. Às pessoas que, direta ou indiretamente, fizeram parte destes anos e estiveram envolvidas neste trabalho quero agradecer imenso por terem contribuído na realização de mais uma etapa na minha vida.

Aos meus pais, obrigada por tudo. Sem o vosso apoio, persistência, paciência, carinho, dedicação e amor não era possível aqui chegar. Obrigada por me terem dado sempre muita força.

Ao meu irmão, pelo apoio, pelas brincadeiras e por me animar nos momentos menos bons ao longo destes anos.

À minha orientadora Joana Gonçalves obrigada pela ajuda, disponibilidade e companheirismo.

À professora Eugénia Gallardo agradeço por todos os ensinamentos, ajuda e motivação ao longo deste ano. Agradeço ainda por se demonstrar sempre disponível em ajudar.

Aos meus colegas Aysa, Ema, Tiago, Sofia, e Ângelo, obrigada pelo companheirismo, pela ajuda e pelo bom ambiente sempre proporcionado.

Aos amigos que a Covilhã me deu, a Roque, a Bea, a Catarina, o Rui, a Margarida e a Raquel, obrigada pelos últimos anos, por todos os bons momentos, pelas conversas, gargalhadas, amizade e ajuda.

Ao Fábio, pelo apoio e carinho, pelos bons momentos e pela enorme paciência que teve comigo.

A todos, muito obrigada.

Resumo

O uso de amostras biológicas alternativas ao sangue e à urina para análises clínicas e toxicológicas tem ganho um enorme interesse nas últimas décadas, uma vez que podem ser obtidas de maneira mais fácil e rápida. Entre estas, encontra-se o fluido oral, vantajoso devido à sua fácil recolha, armazenamento e transporte, para além de que é considerado uma amostra não invasiva que pode ser recolhida sob observação do examinador, estando assim menos sujeita a adulteração ou substituição. Através desta amostra biológica é possível detetar a presença de algumas patologias, bem como detetar a presença de fármacos e outras substâncias.

Os antipsicóticos são fármacos usados principalmente para o tratamento da esquizofrenia, no entanto também podem ser usados para o tratamento de outros problemas psiquiátricos com sintomas psicóticos. O seu objetivo principal é a diminuição da intensidade das alucinações, agitação e delírios das psicoses.

Por vezes, a análise de uma amostra, assim que chega ao laboratório, não é possível e mediante as diferentes condições em que estas amostras podem ser armazenadas, os analitos podem degradar-se, alterando assim a sua concentração na amostra. Neste sentido, os resultados posteriormente obtidos, no momento da análise da amostra, não vão refletir os valores do momento da colheita. De modo a contornar o problema inerente à instabilidade dos analitos, no presente trabalho estudaram-se diferentes conservantes e condições de armazenamento de amostras de fluido oral contendo fármacos antipsicóticos. Os fármacos incluídos no estudo foram a clorpromazina, levomepromazina, ciamemazina, clozapina, haloperidol e quetiapina, os quais foram testados na presença de diferentes conservantes para se encontrar a melhor condição que lhes proporciona uma maior estabilidade. Para esta avaliação, recorreu-se aos *Dried Saliva Spots* (DSS) como técnica de preparação, pré-tratamento e armazenamento das amostras, uma vez que é reconhecida por conferir uma boa estabilidade aos analitos para além de outras vantagens relacionadas com a rotina laboratorial.

Devido ao número elevado de experiências que seriam necessárias realizar para testar a totalidade das diferentes condições de armazenamento, recorreu-se a um desenho experimental que, de forma multivariada, permitiu uma avaliação mais fácil, rápida e económica. As diferentes condições estudadas foram a presença de alta ou baixa concentração de conservante, presença ou ausência de luz, a temperatura e tempo de

armazenamento das amostras. Após realização e análise dos resultados obtidos, foi possível concluir que os analitos permanecem mais estáveis nas amostras de fluido oral, quando armazenadas a 4°C, na ausência de luz e na presença de 300 ng/mL de ácido ascórbico.

Com o armazenamento nestas condições, chegou-se à conclusão que a clorpromazina e a quetiapina apresentavam-se estáveis durante 14 dias, a levomepromazina durante 44 dias, o haloperidol e a clozapina eram estáveis durante 28 dias e a ciamemazina apresentava uma estabilidade de 146 dias.

Palavras-chave

Estabilidade; fluido oral; antipsicóticos; Dried Saliva Spots; desenho experimental

Abstract

The use of alternative biological samples, to blood and urine, for clinical and toxicological analyses has gained huge interest in the last decades, since they can be obtained more easily and rapidly. Among these, there is oral fluid, advantageous due to its easy collection, storage, and transport. In addition, the sample collection is non-invasive with possibility of supervision by the examiner, decreasing the risk of adulteration or replacement. Through the analysis of this biological sample it is possible to detect the presence of some pathologies, as well as the presence of drugs and other substances.

Antipsychotic drugs are mainly used for the treatment of schizophrenia, however they can also be used to treat other psychiatric disorders with psychotic symptoms. The main purpose of these drugs is the reduction of the intensity of hallucinations, agitation, and delirium.

Sometimes it is impossible to analyse a biological sample as soon as it arrives at the laboratory and depending on the different conditions in which samples can be stored, the analytes present in the sample may degrade, resulting in concentration changes. Therefore, the results subsequently obtained, in the moment of analysis, will not correspond to those in the moment of collection. In order to avoid the problem of analyte instability, in the present work different storage conditions of the antipsychotic drugs were tested. The antipsychotic drugs included in this study were chlorpromazine, levomepromazine, cyamemazine, clozapine, haloperidol and quetiapine, and they were tested in oral fluid in the presence of different preservatives in order to find the best conditions that would improve their stability. The Dried Saliva Spots (DSS) technique was used for sample preparation and storage since it is recognized to provide good stability to the analytes amongst other laboratorial advantages.

Due to the high number of experiments needed to be carried out to test all different preservatives and different storage conditions, an experimental design was adopted to evaluate the outcomes in an easier, faster, and more economical way. The different conditions evaluated were the presence of high or low concentration of preservative, presence or absence of light, temperature, and storage time of the samples. After analysis and interpretation of the obtained results, it was possible to conclude that greater stability would be achieved if the oral fluid samples were stored at 4°C, in the absence of light and in the presence of 300 ng/mL of ascorbic acid.

With storage in these conditions, we observed that chlorpromazine and quetiapine were stable for 14 days, levomepromazine for 44 days, haloperidol and clozapine were stable for 28 days and cyamemazine presented a stability of 146 days.

Keywords

Oral fluid; stability; antipsychotics; dried saliva spots; design of experiments

Índice

Dedicatória.....	iii
Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract.....	ix
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas	xv
Lista de gráficos	xvii
Lista de Acrónimos	xix
Capítulo 1-Introdução.....	1
1. Fluido oral.....	1
1.1. Produção, composição, recolha e armazenamento do fluido oral.....	2
1.2. O fluido oral como ferramenta de diagnóstico e de monitorização de fármacos	4
2. Estabilidade das amostras	8
2.1. Métodos para identificação e quantificação de antipsicóticos	11
3. Dried Saliva Spots.....	12
4. Psicofármacos	16
4.1. Antipsicóticos.....	17
4.1.1. Efeitos adversos dos antipsicóticos	18
4.1.2. Monitorização terapêutica	19
Capítulo 2-Justificação do tema e objetivos	21
Capítulo 3-Procedimento experimental	23
1. Materiais e métodos.....	23
1.1 Reagentes.....	23
1.2 Condições cromatográficas e espetrométricas	23
1.3 Amostras	24
1.3.1 Preparação das amostras	24
1.4 Desenho experimental	25
2. Resultados e discussão	27
2.1 Otimização das condições espetrométricas	27
2.2 Resultados obtidos do DoE.....	33
2.2.1 Ácido ascórbico	35
2.2.2 Fluoreto de sódio	42
2.2.3 Azida de sódio.....	49

2.2.4	DoE sem adição de conservantes	51
2.3	Condições finais para o estudo da estabilidade a longo prazo.....	52
2.4	Estudo da estabilidade a longo prazo.....	54
3.	Conclusões e considerações finais.....	62
	Bibliografia:.....	63

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura das glândulas salivares	3
Figura 2: Transporte de biomoléculas do sangue para a saliva	6
Figura 3: Dried Matrix Spots sem amostra e sem corante (A), com amostra mas sem corante (B), com corante mas sem amostra (C) e com amostra biológica e corante (D).	13
Figura 4: Papel de filtro usado para os <i>Dried Saliva Spots</i>	15
Figura 5: Representação esquemática do procedimento de DSS.....	24
Figura 6: Espetro de massa obtido no modo de scan da CPZ a uma concentração de 10 µg/mL.	28
Figura 7: Espetro de massa obtido no modo de scan da LVP a uma concentração de 10 µg/mL.	29
Figura 8: Espetro de massa com os iões originados pela fragmentação do ião 317,1 da CPZ a uma concentração de 5 µg/mL.	30
Figura 9: Espetro de massa com os iões originados pela fragmentação do ião 227,7 da LVP a uma concentração de 5 µg/mL.....	31
Figura 10: Cromatograma relativo aos analitos em estudo à concentração de 200 ng/mL para a CPZ, LVP, CLZ, QTP e CYA e 40 ng/mL para o HAL.	33
Figura 11: Gráficos de Pareto obtidos com demonstração da influência de cada fator e interação de fatores para cada composto individualmente com ácido ascórbico. A-CPZ, B-LVP, C-CYA, D-CLZ, E-HAL, F-QTP	36
Figura 12: Paretos obtidos com demonstração da influência de cada fator e interação de fatores para cada composto individualmente com fluoreto de sódio. A-CPZ, B-LVP, C-CYA, D-CLZ, E-HAL, F-QTP	43
Figura 13: Cromatogramas no primeiro (superior) e sétimo (inferior) dia de extração para a CLZ (200 ng/mL) com azida de sódio (0,1%).....	50
Figura 14: Cromatogramas no primeiro (superior) e sétimo (inferior) dia de extração para a QTP (200 ng/mL) com azida de sódio (0,1%).	50

Lista de Tabelas

Tabela 1: Vantagens e desvantagens do uso do fluido oral como técnica de amostragem.	2
Tabela 2: Diagnósticos realizados recorrendo ao fluido oral como amostra.	8
Tabela 3: Estudos realizados com a técnica de amostragem por DMS.	14
Tabela 4: Modo de ação e prontuário terapêutico de cada tipo de psicofármacos no sistema neuronal e respetivo tempo de ação no organismo.	16
Tabela 5: Efeitos adversos provocados pelos fármacos antipsicóticos.	19
Tabela 6: Matriz com as variáveis para a realização do DoE.	26
Tabela 7: Parâmetros do modo MRM no GC-MS/MS para deteção dos analitos em estudo.	32
Tabela 8: Resultados obtidos através do cálculo do rácio entre os sinais dos analitos e o sinal do padrão interno para o conservante ácido ascórbico.	35
Tabela 9: Resultados obtidos através do cálculo do rácio entre os sinais dos analitos e o sinal do padrão interno para o conservante fluoreto de sódio.	42
Tabela 10: Resultados obtidos através do cálculo do rácio entre os sinais dos analitos e o sinal do padrão interno para o conservante azida de sódio.	49
Tabela 11: Resultados obtidos para as amostras armazenadas a diferentes condições sem adição de conservante.	51
Tabela 12: Resultados obtidos através do cálculo das médias dos resultados obtidos entre o primeiro e o sétimo dia das amostras sem adição de conservante.	51
Tabela 13: Resposta dos analitos com e sem conservante ao fim do armazenamento durante 1 e 7 dias a 4°C na ausência de luz.	53
Tabela 14: Resultados da estabilidade ao longo de 146 dias para os fármacos CPZ, LVP, CYA, CLZ, HAL e QTP (n=3).	55

Lista de gráficos

Gráfico 1: Evolução do consumo de psicofármacos em Portugal continental entre 2000 e 2012.	17
Gráfico 2: Evolução do consumo de psicofármacos em Portugal continental entre 2012 e 2018.	17
Gráfico 3: Efeitos principais na CPZ com ácido ascórbico.	37
Gráfico 4: Efeitos principais na LVP com ácido ascórbico.	37
Gráfico 5: Efeitos principais na CYA com ácido ascórbico.	37
Gráfico 6: Efeitos principais na CLZ com ácido ascórbico.	38
Gráfico 7: Efeitos principais no HAL com ácido ascórbico.	38
Gráfico 8: Efeitos principais na QTP com ácido ascórbico.	38
Gráfico 9: Interações de vários fatores para a CPZ com ácido ascórbico.	39
Gráfico 10: Interações de vários fatores para a LVP com ácido ascórbico.	39
Gráfico 11: Interações de vários fatores para a CYA com ácido ascórbico.	40
Gráfico 12: Interações de vários fatores para a CLZ com ácido ascórbico.	40
Gráfico 13: Interações de vários fatores para o HAL com ácido ascórbico.	40
Gráfico 14: Interações de vários fatores para a QTP com ácido ascórbico.	41
Gráfico 15: Efeitos principais para a CPZ com fluoreto de sódio.	44
Gráfico 16: Efeitos principais para a LVP com fluoreto de sódio.	44
Gráfico 17: Efeitos principais para a CYA com fluoreto de sódio.	44
Gráfico 18: Efeitos principais para a CLZ com fluoreto de sódio.	45
Gráfico 19: Efeitos principais para o HAL com fluoreto de sódio.	45
Gráfico 20: Efeitos principais para a QTP com fluoreto de sódio.	45
Gráfico 21: Interações de vários fatores para a CPZ com fluoreto de sódio.	46
Gráfico 22: Interações de vários fatores para a LVP com fluoreto de sódio.	46
Gráfico 23: Interações de vários fatores para a CYA com fluoreto de sódio.	47
Gráfico 24: Interações de vários fatores para a CLZ com fluoreto de sódio.	47
Gráfico 25: Interações de vários fatores para o HAL com fluoreto de sódio.	47
Gráfico 26: Interações de vários fatores para a QTP com fluoreto de sódio.	48
Gráfico 27: Estabilidade da CPZ em fluido oral armazenado em DSS ao longo de 146 dias.	56
Gráfico 28: Estabilidade da LVP em fluido oral armazenado em DSS ao longo de 146 dias.	57
Gráfico 29: Estabilidade da CYA em fluido oral armazenado em DSS ao longo de 146 dias.	58

Gráfico 30: Estabilidade da CLZ em fluido oral armazenadas em DSS ao longo de 146 dias.	59
Gráfico 31: Estabilidade do HAL em fluido oral armazenado em DSS ao longo de 146 dias.	60
Gráfico 32: Estabilidade da QTP em fluido oral armazenado em DSS ao longo de 146 dias.	61

Lista de Acrónimos

APG	Antipsicóticos de primeira geração
ASG	Antipsicóticos de segunda geração
CCNI	Ciclina I
CLZ	Clozapina
CPZ	Clorpromazina
CV	Coefficiente de variação
CYA	Ciamemazina
DBS	<i>Dried Blood Spots</i>
DMS	<i>Dried Matrix Spots</i>
DoE	Desenho experimental
DPS	<i>Dried Plasma Spots</i>
DSS	<i>Dried Saliva Spots</i>
DTT	Ditiotreitol
DUS	<i>Dried Urine Spots</i>
EGFR	Recetor do fator de crescimento epidérmico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FGF19	Fator de crescimento de fibroblastos 19
FRS2	Substrato 2 do recetor do fator de crescimento de fibroblastos
GC	Cromatografia gasosa
GC-NPD	Cromatografia gasosa com detetor de azoto e fósforo
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa
GC-MS/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa em <i>tandem</i>
GREB1	Gene regulado pelo estrogénio no cancro da mama
HAL	Haloperidol
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de matriz de diodos
LC	Cromatografia líquida
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espetrometria de massa
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espetrometria de massa em <i>tandem</i>
LC-DAD	Cromatografia líquida com um detetor de matriz de diodos
MRM	Monitorização de múltiplas reações
TOF/MS	Espetrometria de massa com detetores de tempo de voo
TCEP	Tris(2-carboxietil) fosfina

Capítulo 1-Introdução

1. Fluido oral

No campo da toxicologia forense, o sangue e a urina são as amostras de eleição para análises *ante* e *post-mortem*. O sangue, apesar de indicar uma exposição recente a fármacos ou outras substâncias, apresenta um método de recolha invasivo. No que respeita à urina, esta é uma amostra que facilmente pode ser adulterada, para além de que não pode ser aplicada para a deteção de todas as substâncias como é o caso de substâncias altamente lipossolúveis que não se excretam por esta via[1, 2]. Amostras como o suor, o cabelo e o fluido oral ou, no caso de exposição a substâncias durante o período fetal, o mecónio, o líquido amniótico e o tecido ou sangue do cordão umbilical, têm vindo a despertar interesse, especialmente por parte de laboratórios clínicos, no campo da química analítica e toxicologia forense, uma vez que constituem uma alternativa às amostras convencionais[2–4]. Estas amostras não convencionais apresentam muitas vantagens, nomeadamente uma maior sensibilidade (tendo em conta a baixa quantidade de amostra disponível) e uma recolha por métodos fáceis e não invasivos, que pode ser realizada sob supervisão, de modo a minimizar as possíveis adulterações[3]. O fluido oral foi usado pela primeira vez como amostra alternativa na década de 70 para determinação de fenobarbital, fenitoína, primidona, etossuximida, antipirina e cafeína, e desde então a sua aplicação em contextos clínicos e forenses tem sido bastante explorada[5].

O aumento da utilização desta matriz biológica deve-se ao facto de possuir inúmeras vantagens, comparativamente às amostras convencionais de sangue e urina. Porém, o fluido oral também apresenta algumas desvantagens quando comparado com essas mesmas amostras[4, 6–8]. Na tabela 1 encontram-se descritas as vantagens e desvantagens desta matriz biológica.

Tabela 1: Vantagens e desvantagens do uso do fluido oral como técnica de amostragem [4, 6–8].

Vantagens	Desvantagens
Recolha fácil, rápida e não invasiva	Técnica de amostragem não estéril
Recolha realizada sob observação do examinador, sendo menos propensa a adulteração/substituição	Amostras sujeitas a degradação bacteriana e contaminação com interferentes da matriz
Fácil transporte	Almofadas de recolha podem contribuir com interferentes ou impedir a libertação do analito
Menor ligação do fármaco a proteínas	Volume de amostra reduzido
Droga mãe presente em maiores concentrações	Fluido viscoso
Baixo risco de contaminação	Reduzida concentração de analitos
Não coagula	Procedimento de recolha não uniformizado

É ainda de realçar que substâncias administradas oralmente, bem como aquelas que podem ser fumadas, podem encontrar-se em elevadas concentrações após consumo recente. Isto deve-se ao facto de poder ocorrer acumulação de resíduos na cavidade oral, podendo comprometer a precisão dos resultados (as concentrações determinadas podem não refletir a concentração real do medicamento no sangue)[4].

1.1. Produção, composição, recolha e armazenamento do fluido oral

Os termos fluido oral e saliva são muitas vezes usados para designar a mesma amostra biológica[9], no entanto, a saliva é o fluido recolhido apenas de uma glândula específica e é livre de outros componentes[10], por outro lado, o fluido oral (saliva mista) provém principalmente de três grandes glândulas salivares: parótida (cerca de 20%), submandibular (cerca de 65%) e sublingual (entre 7 a 8%). Também algumas glândulas menores (cerca de 10%) estão envolvidas na produção desta amostra biológica[11]. As glândulas salivares (figura 1) são compostas por células epiteliais especializadas, por unidades secretoras básicas, que consistem em aglomerados de células designados por ácinos, e por um sistema de ductos[12]. Inicialmente, as células mioepiteliais contraem-se como resposta aos estímulos nervosos e induzem as células acinares a produzirem e secretarem fluido. À medida que vai passando pelos ductos, este fluido vai alterando a sua composição química para ser libertado na cavidade oral sob a forma de um fluido hipotónico. Estas células acinares podem ser classificadas como células serosas, que estão localizadas nas glândulas parótidas, e células mucosas, localizadas nas glândulas sublinguais. As glândulas submandibulares são compostas por uma mistura dos dois tipos de células[13]. Se por um lado, as células serosas, secretam um líquido aquoso essencialmente desprovido de mucinas, por outro lado, as mucosas,

produzem uma secreção muito rica em mucinas. Portanto, as células acinares secretam um fluido composto por água (cerca de 99%), eletrólitos (cálcio, magnésio, sódio, potássio, cloreto, bicarbonato, fosfato), muco e enzimas, que fluem dos ácinos para os ductos coletores[9, 13, 14]. Assim, podem ser observadas diferenças na concentração de sais, iões e proteínas totais existentes entre os fluidos produzidos por cada tipo de glândula[11].

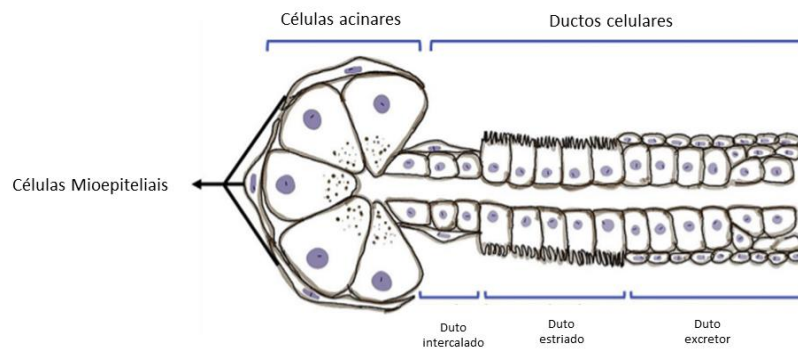


Figura 1: Estrutura das glândulas salivares- Adaptado de Proctor and Shaalan[15]

O fluido oral é, assim, considerado uma mistura da saliva segregada pelas glândulas e de constituintes que não se originam nas glândulas salivares, como o fluido gengival crevicular, o soro transudato da mucosa, resíduos alimentares, compostos sanguíneos (provenientes em caso de inflamação oral ou lesão da mucosa), células epiteliais e imunológicas e microrganismos[14, 16]. Esta amostra biológica apresenta pH entre 6 e 7 e possui um papel protetor ativo na manutenção da higiene, com várias funções ao nível da saúde e homeostase oral, proteção da mucosa contra danos mecânicos, formação do bolo alimentar e digestão prévia dos alimentos, devido à presença da α -amilase e outras enzimas[11, 16].

Um adulto saudável pode produzir entre 1 L e 1,5 L de fluido oral por dia, sendo os fluxos típicos de aproximadamente 0,05 mL/min durante o sono, 0,5 mL/min quando cospe e de 1 mL/min a 3 mL/min com a mastigação de uma pastilha[9, 11]. A produção e composição salivar dependem da atividade do sistema nervoso autónomo (estímulos α - β adrenérgicos e colinérgicos) e de diversos fatores fisiológicos e patológicos, como a idade, fatores hereditários, estado emocional do indivíduo, alterações hormonais, uso de fármacos, atividade física, ritmo circadiano, bem como o facto da secreção salivar ser basal ou estimulada[7, 16, 17]. Em média, a taxa de fluxo do fluido não estimulado numa pessoa saudável é de 0,3 mL/min, e pode ser recolhido pelo método de *drooling* (o fluido oral é deixado cair diretamente no frasco de recolha), *spitting* (cuspir diretamente no frasco de recolha), sendo que este é 14 vezes mais propenso a possuir

bactérias que o método de recolha por drooling[16], com uma “almofada” absorvente ou por sucção. Para além destas técnicas, encontram-se comercializados dispositivos para proceder a recolha[14]. Existe ainda a possibilidade de recolha de saliva de apenas uma glândula específica, no entanto, este tipo de recolha é realizado por canulação, o que é considerado um método de recolha invasivo, demorado e que necessita de um profissional especializado para a sua realização[14, 18]. O fluido oral estimulado é recolhido recorrendo à ação da mastigação, utilizando para tal uma pastilha ou parafina, ou recorrendo à estimulação gustatória, através da aplicação de 1 gota de ácido cítrico na língua. Aquando da estimulação da produção de fluido oral, a taxa de fluxo aumenta, sendo, em média, de 7 mL/min[11, 14]. O fluido oral estimulado permite uma melhor deteção de marcadores cancerígenos[19], no entanto, pode induzir a uma incorreta quantificação da presença de fármacos ou outras substâncias devido à alteração do pH e da quantidade de fluido, bem como à alteração da concentração de algumas moléculas presentes no fluido[14, 17, 19].

O método de recolha do fluido oral varia consoante o fim a que se destina a análise. Como tal devem ser fornecidas informações detalhadas sobre o protocolo de recolha de modo a adotar procedimentos corretos, tais como evitar a ingestão de alimentos, líquidos e a escovagem dos dentes pelo menos 30 minutos antes da recolha[16]. Alguns fatores tais como o procedimento de armazenamento e o tempo após a recolha podem afetar a análise uma vez que algumas variáveis bioquímicas podem ser afetadas pela temperatura ou pelo crescimento bacteriano[16]. As amostras de fluido oral devem ser congeladas o mais rápido possível após a recolha (temperatura $\leq -20^{\circ}\text{C}$), de modo a manter a integridade da amostra, no entanto, se não for possível, devem ser armazenadas a 4°C (no máximo até 6h) para evitar o crescimento microbiano e a degradação de alguns compostos[20]. Estas amostras podem ainda ser congeladas a -80°C durante anos e mesmo assim manter a sua integridade inicial. Outro modo para processamento e armazenamento das amostras, é o congelamento rápido em azoto líquido com o uso de inibidores enzimáticos[20].

1.2. O fluido oral como ferramenta de diagnóstico e de monitorização de fármacos

Alguns dos analitos, tanto endógenos como exógenos, passam para o fluido oral a partir do plasma sanguíneo uma vez que as glândulas salivares estão cercadas por capilares sanguíneos e são altamente permeáveis, favorecendo assim a permuta de substâncias entre o sangue e as células acinares[7, 8, 14]. Constituintes como DNA, RNA, hormonas, enzimas, metabolitos e anticorpos, ao estarem presentes na corrente sanguínea conseguem passar para o fluido oral, alterando a sua composição

bioquímica[8, 21]. Ao serem corretamente identificadas, as biomoléculas presentes nesta matriz podem eventualmente funcionar como biomarcadores para a detecção precoce de doenças orais e sistêmicas[21, 22], enquanto que a presença de fármacos ou dos seus metabolitos refletem melhor os seus efeitos farmacológicos ou tóxicos no organismo[23].

Considera-se que as permutas dos constituintes presentes no plasma sanguíneo com o fluido oral se dão através de 3 grandes vias intra e extracelulares, sendo elas a difusão passiva, o transporte ativo e a ultrafiltração (figura 2)[14]. A difusão passiva é considerada a via intracelular mais comum de transporte de moléculas, como é o caso de hormonas esteroides[14] e fármacos[23]. Para estas se difundirem do sangue para o fluido oral têm de atravessar as paredes capilares sanguíneas, o espaço intersticial entre os capilares e as glândulas salivares, e posteriormente a membrana basal, o citoplasma e a membrana luminal das glândulas salivares. Assim, variáveis como o pH do plasma e do fluido oral, o pKa, a lipossolubilidade, a carga, o peso molecular, a estereoquímica, o grau de ligação a proteínas plasmáticas e a clearance das moléculas, as enzimas salivares existentes e a taxa de fluxo salivar podem afetar a difusão destas do plasma para o fluido oral[7, 24, 25]. Portanto, para os fármacos atravessarem facilmente a membrana existente entre as duas matrizes devem estar na sua forma livre (não ligada a proteínas plasmáticas), não ionizada e com peso molecular inferior a 500Da[7]. Deste modo, a concentração de fármacos presente no fluido oral representa a fração livre e não ionizada do fármaco existente no plasma sanguíneo[25].

Segundo a equação de Handerson-Hasselbalch, no equilíbrio, o pKa do fármaco e a diferença de pH existente entre as duas matrizes é que determinam a quantidade de fármaco presente no fluido oral[7, 25]. Normalmente, os fármacos básicos concentram-se mais nesta matriz, uma vez que ao chegarem a um meio mais ácido facilmente se ionizam e ficam retidos. Por outro lado, os fármacos mais ácidos concentram-se mais no plasma[7]. Logo, por norma, a concentração de fármacos básicos existentes no fluido oral é mais elevada que no plasma enquanto que a concentração de fármacos ácidos é mais elevada no plasma que no fluido oral[26]. Porém, existem fármacos instáveis na matriz biológica alternativa, os quais muitas vezes não podem ser usados para monitorização terapêutica a menos que se usem outras estratégias para estabilizar os analitos[23].

O transporte ativo, também uma via intracelular de transporte de moléculas, é realizado contra o gradiente de concentração através das células secretoras das glândulas e é responsável pelo transporte dos constituintes iónicos e de IgA secretora

do plasma sanguíneo para o fluido oral[14, 27]. A ultrafiltração é uma via de transporte extracelular e consiste na filtração de moléculas através dos espaços existentes entre os ácinos e as células dos ductos. Este tipo de transporte pode ainda ocorrer através das *gap junctions* das células. A ultrafiltração permite apenas a passagem de moléculas com um peso molecular inferior a 1900 Da, como a água, os esteroides, as catecolaminas e os iões, sendo a sua concentração no fluido oral 300 a 3000 vezes inferior àquela encontrada no plasma sanguíneo[7, 14].

Por sua vez, a transudação, outro tipo de transporte de biomoléculas do sangue para o fluido oral, consiste na passagem dos componentes plasmáticos através da mucosa oral ou do fluido gengival crevicular. Este transporte é responsável pela presença de albumina no fluido oral[17, 18].

Relativamente à existência de biomarcadores no fluido oral, segundo Yoshizawa *et al.*[8] apesar destes mecanismos explicarem a sua presença nesta matriz, muitos estudos ainda são necessários para provar estas hipóteses. Se tal se comprovar, é então possível afirmar que o fluido oral tem a capacidade de comunicar o estado de saúde de um indivíduo e refletir o estado fisiológico do organismo[8, 21].

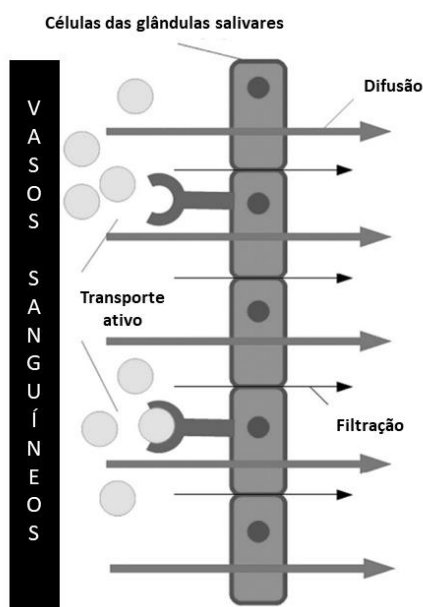


Figura 2: Transporte de biomoléculas do sangue para a saliva- Adaptado de Pfaffe et al. [14]

A investigação na área da metabolómica salivar é recente, sendo que nos últimos 10 anos tem havido um aumento acentuado neste campo[28]. Apesar dos diversos estudos existentes nesta área, os mais realizados são acerca de possíveis biomarcadores presentes no fluido oral que identifiquem a presença de doenças[28].

Num estudo recente realizado por Meleti *et al.*[29], no qual foram analisados 79 artigos sobre o uso de biomarcadores salivares para a detecção de doenças sistêmicas e tumores malignos, 87% dos estudos analisados apresentaram uma boa correlação entre 1 ou mais biomarcadores detetados no fluido oral e a patologia associada à presença desses biomarcadores. No entanto apenas 19 destes estudos foram concordantes com a maioria dos critérios definidos pelo Instituto Nacional de Saúde (NIH) dos Estados Unidos[29]. Teoricamente, a concentração de analitos presente no fluido oral é mais baixa que a concentração dos mesmos no plasma, porém devido à maior sensibilidade dos novos instrumentos analíticos, com os quais a maioria dos laboratórios já se encontra equipado, é possível detetar a presença de concentrações reduzidas [6, 30]. Segundo Gardner *et al.*[28] o potencial dos metabolitos salivares, enquanto biomarcadores para diagnóstico de doenças, é promissor[28], no entanto, mais investigação é necessária no sentido de melhorar os sistemas de identificação molecular salivar e padronizar os protocolos analíticos [22]. O desenvolvimento de tecnologias (semelhantes às que já existem para a detecção de HIV, os OraQuick®) que permitam a detecção fiável de biomarcadores para o diagnóstico e acompanhamento de doenças sistêmicas/tumores malignos, através da avaliação do fluido oral, é um possível alvo da medicina moderna[29].

Tendo como base de pesquisa o PubMed, com palavras-chave como “*diagnostic*” e “*oral fluid*”, foram poucos os estudos de diagnóstico de doenças com base em fluido oral que foram realizados nos últimos 2 anos. Na tabela 2 apresentam-se estes estudos bem como outros realizados para o diagnóstico de outras doenças.

Tabela 2: Diagnósticos realizados recorrendo ao fluido oral como amostra.

Diagnóstico	Marcador(es)	Referência
Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)	Anticorpos do HIV	[31]
Vírus da Hepatite B (HBV)	DNA do HBV; Antígenos, anticorpos e DNA do HBV	[32];[33]
Sífilis	Anticorpo treponémico	[34]
Parvovírus B19 (B19V)	Anticorpos IgM e IgG do B19V	[35]
Periodontite	Metaloproteinase-8 da matriz	[36]
Alzheimer	Acetilcolinesterase e pseudocolinesterase	[37]
Doença de Parkinson	Heme oxigenase-1	[38]
Síndrome de <i>Sjögren's</i>	Catepsina D, α -enolase e β -2-microglobulina	[39]
Problemas gástricos, doença gengivoperiodontal; Doenças gastroesofágicas	Bactéria <i>helicobacter pylori</i>	[40]; [41]
Síndrome de <i>Cushing</i>	Cortisol	[42]
Cancro da mama	c-erbB-2	[43]
Cancro do pulmão	CCNI, EGFR, FGF19, FRS2, GREB1	[44]
Doenças cardiovasculares	Proteína C reativa e homocisteína;	[45]

CCNI-Ciclina I; EGFR- Recetor do fator de crescimento epidérmico; FGF19-Fator de crescimento de fibroblastos 19; FRS2- substrato 2 do recetor do fator de crescimento de fibroblastos; GREB1-Gene regulado pelo estrogénio no cancro da mama

2. Estabilidade das amostras

Devido a possíveis questões burocráticas ou ao volume de trabalho laboratorial, nem sempre é possível analisar de imediato as amostras que chegam aos laboratórios, podendo haver, assim, um atraso de semanas, meses ou até mesmo anos desde o momento de recolha/chegada das amostras até ao momento da sua análise e quantificação das substâncias nelas presentes[46]. Assim, conhecer e avaliar a estabilidade dos analitos em diversas matrizes biológicas após o seu manuseio e armazenamento sob diferentes condições, é essencial para os toxicologistas analíticos de modo a conseguir interpretar os resultados obtidos[47].

A degradação do analito pode dever-se à sua ligação a proteínas da matriz, às suas propriedades físico-químicas, ao dispositivo de recolha, às condições de armazenamento, ou à reação do analito com outros componentes, como enzimas. Com base nestas premissas, deve-se ter em conta o modo de preparação, processamento (condições de armazenamento) e análise das amostras, para que a concentração de analito, desde a recolha da amostra, não seja afetada por possíveis degradações. Nestas

situações, a adição de conservantes ou preservantes às amostras antes do seu armazenamento podem auxiliar na minimização da degradação de analitos[46, 47].

Devem ser preparadas soluções desse analito na matriz biológica em estudo e analisar alíquotas inicialmente, após a aplicação das amostras e após as condições de armazenamento que irão ser avaliadas. Posteriormente, após a análise, a estabilidade das soluções armazenadas a diferentes condições deve ser testada através da comparação da sua resposta com soluções preparadas no imediato[48, 49].

A maioria dos estudos existentes sobre a estabilidade dos fármacos em diversas matrizes visam o desenvolvimento de métodos bioanalíticos, sendo normalmente estudadas a estabilidade a curto prazo, longo prazo e após ciclos de congelamento-descongelamento[50]. Contudo, na maioria das vezes, os resultados obtidos acerca da estabilidade das amostras a longo prazo e após certas condições de armazenamento nestes estudos são insuficientes ou mesmo inexistentes[50].

Segundo a literatura [50–52], a estabilidade de antipsicóticos foi estudada em diferentes matrizes, com diferentes condições de armazenamento e com a adição de conservantes. Fisher *et al.*[52] usaram ácido ascórbico, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) e ditioneitol (DTT) como conservantes para tentar melhorar a estabilidade da Olanzapina em fluido oral e sangue total hemolisado e heparinizado, tendo concluído que o ácido ascórbico era o conservante mais eficiente.

Moretti *et al.*[51] desenvolveram um método analítico utilizando um equipamento de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em *tandem* (LC-MS/MS) para identificar e quantificar antidepressivos e antipsicóticos em *Dried Blood Spots* (DBS). Das amostras *post-mortem* recolhidas, conseguiram identificar 17 analitos, para os quais desenvolveram o método analítico, destes, 7 eram antipsicóticos. A estabilidade destes 7 antipsicóticos foi estudada, sem adição de nenhum conservante, num período de 3 meses em DBS (armazenados à temperatura ambiente, no escuro) e em amostras de sangue (armazenadas a -20°C). Em ambos os métodos de armazenamento, às amostras foi adicionado tampão fosfato e extraídas com recurso à extração em fase sólida. Nos DBS armazenados à temperatura ambiente, a clotiapina demonstrou ser instável após 2 semanas de armazenamento e apresentou perdas superiores a 70% após os 3 meses de armazenamento, a dixirazina, o haloperidol e a amisulprida mantiveram-se estáveis durante o tempo de estudo, a paliperidona manteve-se estável durante as 3 primeiras semanas, degradando-se em mais de 50% após os 3 meses de armazenamento, tal como a pimozida. A quetiapina numa das

amostras dos DBS demonstrou ser instável logo após a primeira semana de armazenamento, enquanto que nas outras duas amostras se manteve estável. No sangue armazenado a -20°C a clotiapina, a amisulprida, a dixirazina, o haloperidol, a quetiapina e a paliperidona mantiveram-se estáveis durante os 3 meses de estudo, enquanto que a pimozida nesta matriz demonstrou ser instável. É importante salientar que neste estudo em concreto, os autores utilizaram os DBS unicamente como técnica de recolha e armazenamento da amostra e não como técnica de pré-tratamento.

Num outro estudo realizado por Saar *et al.*[50] foi avaliada a estabilidade de 30 antipsicóticos, a alta e baixa concentração, presentes numa amostra de sangue, durante 10 semanas a 4 temperaturas diferentes (20°C , 4°C , -20°C e -60°C). As amostras de sangue, livres de fármacos, foram colocadas em tubos de polipropileno de 10 mL que continham 30 mg de oxalato de potássio e 200 mg de fluoreto de sódio, e posteriormente foram fortificadas. Apenas 8 antipsicóticos demonstraram ser instáveis ou pouco estáveis em algumas condições (a maioria a elevadas concentrações de analitos na amostra, independentemente da temperatura de armazenamento). Assim, para estes fármacos o estudo foi prolongado por mais 10 semanas, usando apenas amostras com elevadas concentrações de antipsicóticos e variando apenas as temperaturas de armazenamento (20°C , 4°C , -20°C e -60°C). Observou-se, no geral, que a maioria dos antipsicóticos, durante as 20 semanas apresentaram menos perdas com o armazenamento a -20°C e -60°C , exceto a clorpromazina que apresentou uma maior instabilidade quando armazenada a -20°C , comparativamente ao armazenamento a 20°C . Apesar disto, verificou-se uma grande instabilidade (com perdas superiores a 15%) dos analitos. Neste estudo avaliou-se a estabilidade dos analitos na matriz biológica, sem recurso a nenhum tipo de dispositivos de recolha.

Também Fisher *et al.*[52] estudaram a estabilidade de 10 antipsicóticos de segunda geração em plasma, sangue total hemolisado, fluido oral e soro humano e de bovino. Observaram que no plasma humano (com EDTA como anticoagulante), todos os analitos demonstraram ser estáveis durante pelo menos 1 ano a -20°C , 2 semanas com armazenamento entre 2°C a 8°C , 3 dias armazenados à temperatura ambiente e após sofrerem 3 ciclos de congelamento/descongelamento. Os antipsicóticos dihidroaripirazol, olanzapina e a quetiapina foram os únicos que demonstraram ser estáveis nesta matriz biológica após armazenamento durante 2 anos a -20°C . No soro humano e de bovino, a estabilidade dos fármacos foi reduzida, especialmente para o dihidroaripirazol, a norclozapina, a olanzapina e a quetiapina. Apenas a -20°C é que a maioria dos fármacos apresentou uma boa estabilidade no soro de bovino[52]. Em sangue total hemolisado, os analitos também demonstraram ser todos estáveis durante

2 dias a temperatura ambiente e 1 semana armazenado entre 2°C e 8°C. A -20°C, nesta matriz biológica, todos os analitos se apresentaram estáveis durante 2 meses, exceto a clozapina, a norclozapina e a olanzapina. O sangue hemolisado, ao ser tratado com ácido ascórbico, apresentou menos perdas de olanzapina após 23 dias a -20°C e durante ciclos de congelamento/descongelamento, enquanto que o seu tratamento com os outros conservantes (DTT e TCEP) apresentou resultados semelhantes aos do sangue hemolisado não tratado. No fluido oral todos os analitos foram estáveis por 2 dias à temperatura ambiente, 1 semana entre 2 e 8°C e dois meses a -20°C, exceto a olanzapina. Para tentar melhorar a estabilidade deste fármaco, o fluido oral foi tratado com ácido ascórbico e TCEP, verificando-se uma melhoria na sua estabilidade a -20°C[52]. Do mesmo modo que no estudo anterior foi avaliada a estabilidade dos compostos na matriz biológica sem recurso a dispositivos de recolha.

2.1. Métodos para identificação e quantificação de antipsicóticos

A análise de substâncias presentes em fluido oral, em ambiente laboratorial, pode ser realizada por métodos imunoquímicos e métodos cromatográficos. Os métodos imunoquímicos são frequentemente usados, no entanto, devido à sua reduzida especificidade, possibilidade de reatividade cruzada e presença de interferentes, por vezes resultam em falsos negativos e falsos positivos.[53]. Assim, para confirmar os resultados obtidos nestes testes, muitas vezes recorrem-se a técnicas cromatográficas acopladas à espetrometria de massa, uma vez que têm maior especificidade, seletividade e sensibilidade e permitem efetuar uma análise quantitativa[53]. Dentro das técnicas cromatográficas, a cromatografia gasosa (GC) acoplada à espetrometria de massa (MS) ou espetrometria de massa em *tandem* (MS/MS) e a cromatografia líquida (LC) acoplada à MS/MS ou à MS com detetores de alta resolução, nomeadamente tempo de voo (TOF/MS) são as técnicas mais usadas para a determinação de antipsicóticos[54]. A cromatografia acoplada à espetrometria de massa em *tandem* permite obter uma maior sensibilidade, especificidade, precisão e reprodutibilidade[55, 56].

A LC-MS e a LC-MS/MS são técnicas analíticas que permitem a análise e quantificação de compostos mais polares, não voláteis, termolábeis e de elevado peso molecular[9, 57]. No entanto, estas técnicas apresentam limitações tais como a obtenção de espetros com fragmentações diferentes entre os equipamentos de vários laboratórios. Portanto, para estes equipamentos não existem bibliotecas de espetros como as que existem para GC-MS, estando apenas disponíveis bibliotecas internas, uma vez que a reprodutibilidade dos espetros gerados por *electrospray*, entre os equipamentos de diferentes laboratórios, é fraca, dificultando a compilação de bibliotecas de espetros

comuns[9, 56, 57]. Outra limitação destas técnicas é a possibilidade da formação de aductos devido à presença de solvente na câmara de ionização. O solvente introduz sais de Na⁺, K⁺, NH₄⁺ que ao serem combinados com os analitos vão produzir iões com uma razão massa/carga 23, 40 ou 18 vezes superior à expectável, dificultando a interpretação dos espectros de massa[9, 56]. Em LC-MS/MS pode ainda ocorrer a co-eluição de moléculas durante a ionização dos analitos, resultando em supressão ou aumento dos sinais iónicos[58].

Uma vez que a maioria dos antipsicóticos não são voláteis, o método mais usado para a sua separação, deteção e quantificação é a LC-MS/MS [55, 59], no entanto Rosado *et al.*[59] validaram um método por GC-MS/MS que permitiu determinar antipsicóticos em fluido oral.

A GC-MS é considerada a técnica de eleição para confirmação dos testes de *screening* positivos, em toxicologia clínica e forense, devido à sua elevada reprodutibilidade. É uma tecnologia que se encontra presente na maioria dos laboratórios e permite a obtenção do mesmo espectro de massas para as mesmas amostras entre diferentes laboratórios, desde que as condições de ionização sejam as mesmas (70 eV). Permite a análise de analitos de baixo peso molecular, voláteis e estáveis a altas temperaturas, possuindo ainda uma enorme variedade de bibliotecas de espectros que permite uma melhor identificação dos analitos[9, 57, 60]. A grande desvantagem desta técnica prende-se com o facto de na maioria das vezes ser necessário um passo de derivatização química, de modo a possibilitar a identificação de analitos polares, termolábeis e não voláteis[61]. A derivatização química consiste então na conversão de um analito numa estrutura diferente da original, conferindo-lhe assim propriedades mais compatíveis com as condições cromatográficas[62]. Existem várias desvantagens apontadas a este passo, nomeadamente o tempo necessário para a derivatização, uma vez que a rapidez da análise toxicológica é fundamental[60], e a possível complicação da interpretação dos dados analíticos obtidos, visto que o derivatizante pode introduzir impurezas nas amostras e a quantidade adicionada pode por um lado gerar um grande sinal e ocultar os sinais dos outros compostos, ou então por outro lado se a quantidade de derivatizante não for suficiente os analitos podem não ser transformados corretamente[61, 62].

3. Dried Saliva Spots

A técnica de *Dried Matrix Spot* (DMS) é uma técnica inovadora que consiste na recolha de um fluido biológico que é colocado num *spot* de um papel específico e deixado a

secar. Após a secagem da amostra, o *spot* é cortado e o seu conteúdo é extraído e analisado[63].

Esta técnica tem atraído uma considerável atenção, nomeadamente no campo da toxicologia analítica e forense. O reduzido volume de amostra necessário, a melhor estabilidade que os analitos apresentam, o fácil transporte e armazenamento das amostras, bem como o baixo risco de contaminação e os baixos custos associados, são as vantagens que esta técnica apresenta[64]. Relativamente à recolha, esta pode ser realizada com condições favoráveis ao paciente uma vez que pode ser feita em casa, favorecendo pessoas com doenças crónicas ou com reduzida mobilidade. Também apresenta vantagens para os profissionais de saúde, uma vez que poupam tempo na recolha das amostras aos vários pacientes. O envio das amostras é posteriormente feito através do correio[65].

Com a técnica de DMS existe, ainda, a possibilidade de uma maior adesão da população para alguns estudos, uma vez que a recolha é feita de forma fácil, rápida e pode ser realizada no conforto de casa. Quanto ao armazenamento das amostras em papel de filtro, a degradação dos analitos presentes nas matrizes é menor[65] e a sua extração é mais fácil devido à maior retenção dos componentes da matriz no papel[64]. De um modo geral, se a análise for realizada no período máximo de um mês após a recolha, os DMS podem ser guardados à temperatura ambiente, no entanto, se a análise for realizada muito tempo depois da recolha, é recomendado que o armazenamento dos *spots* seja feito sob refrigeração com controlo do grau de humidade[65]. Nos DMS, por vezes, é usado um corante indicador (figura 3) para fluidos que apresentem pouca ou nenhuma coloração, como a urina, fluido oral, plasma, soro, lágrimas, líquido cefalorraquidiano, entre outros, de modo a serem mais facilmente identificados. Apesar disto, o uso de corantes pode não ser aconselhado para todos os fluidos ou analitos porque a elevada concentração de corante presente nos *spots* pode afetar a seletividade do método para os analitos de interesse[66].

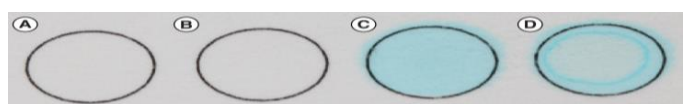


Figura 3: Dried Matrix Spots sem amostra e sem corante (A), com amostra mas sem corante (B), com corante mas sem amostra (C) e com amostra biológica e corante (D). Adaptado de Zimmer *et al.*[66]

Na tabela 3 encontram-se compilados alguns estudos realizados nos últimos 2 anos, em toxicologia, com base na amostragem por DMS. Estes foram obtidos na base de dados

PubMed com “*Dried Spots*”, “*Dried Matrix Spots*”, “*Dried Urine Spots*” e “*Dried Plasma Spots*” como palavras chave para a pesquisa.

Tabela 3: Estudos realizados com a técnica de amostragem por DMS.

Amostra	Técnica usada	Analitos	Referência
DPS	LC-MS/MS	Levetiracetam, Lacosamida, Topiramato, Etossuximida, Lamotrigina, Rufinamida, Zonisamida, Primidona e Oxcarbazepina e o seu metabolito ativo 10-OH-mono-hidroxicarbazepina	[67]
DBS	GC-MS/MS	Diazinão, Clorpirifos, Etil Paratião, Clorfenvinfos e Quinalfos	[68]
DBS DUS DPS	LC-MS/MS	Oxicodona, Noroxicodona, Oximorfona	[69]
DUS	ELISA/GC-NPD	Morfina	[70]
DBS DPS	LC-DAD	Enantiómeros da Asenapina	[71]

DBS: *Dried Blood Spots*; DUS: *Dried Urine Spots*; DPS: *Dried Plasma Spots*; GC-NPD: Cromatografia gasosa com detetor de azoto e fósforo; LC-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em *tandem*; GC-MS/MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em *tandem*; LC-DAD: Cromatografia líquida com um detetor de matriz de díodos; ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática.

Apesar dos DBS serem a abordagem de DMS mais usada em monitorização terapêutica, bem como na análise de drogas de abuso e seus metabolitos, esta técnica pode tornar-se complicada devido à necessidade de técnicos especializados na recolha de sangue e de dispositivos específicos. Devido a estas desvantagens, houve a necessidade de se começar a usar matrizes alternativas mais simples e menos invasivas, especialmente em crianças, recém-nascidos, idosos ou pacientes com doenças graves[63].

Atualmente, existem alguns estudos que visam avaliar a aplicação de DMS a outras matrizes biológicas, nomeadamente o fluido oral, onde estes dispositivos de recolha se designam por *Dried Saliva Spots* (DSS). Os DSS apresentam um modo de utilização baseado nos DMS, assim, inicialmente deposita-se um volume de amostra entre 50 e 100 µL num papel de filtro (figura 4) e o mesmo é deixado a secar à temperatura ambiente. Posteriormente, uma pequena quantidade de solventes orgânicos apropriados são adicionados, os analitos alvo presentes na amostra são extraídos e subsequentemente analisados. As vantagens dos DSS, tal como os DMS, prendem-se

com o facto de ser uma técnica simples, precisa e não invasiva que confere boa estabilidade ao analito, tem baixos custos associados e um baixo risco de contaminação. Permite ainda um fácil transporte e armazenamento das amostras[72].

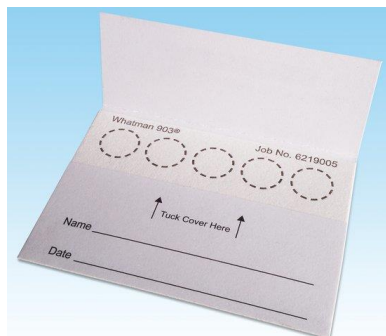


Figura 4: Papel de filtro usado para os *Dried Saliva Spots*. Adaptado de [73]

No âmbito da toxicologia analítica e forense, têm sido desenvolvidos estudos utilizando DSS[54, 63, 64, 72, 74–78]. De acordo com a base de dados PubMed, e recorrendo a “*Dried Saliva Spots*” e “*Dried Oral Fluid Spots*” como palavras chave para a pesquisa, foram poucos os estudos encontrados com a aplicação desta técnica. Abdel-Rehim *et al.*[74] foram os primeiros a demonstrar esta técnica para o fluido oral, recorrendo aos DSS e à LC-MS/MS para triagem e determinação da lidocaína em amostras de saliva. Mais tarde, Carvalho *et al.*[75] aplicaram e validaram um método para a determinação de antiepiléticos em fluido oral recorrendo também aos DSS como técnica para preparação de amostras e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de matriz de diodos (HPLC-DAD). Mais recentemente, Caramelo *et al.*[54] realizaram a validação de um método analítico para a determinação de clorpromazina, levomepromazina, ciamemazina, clozapina, haloperidol e quetiapina, e Ribeiro *et al.*[72] desenvolveram e validaram um método para determinar a presença de metadona e o seu principal metabolito, o 2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP). Ambos os trabalhos foram realizados em amostras de fluido oral usando a abordagem de DSS com análise por GC-MS/MS. Também Jacques *et al.*[64] desenvolveram e validaram um método que permite a quantificação de cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, anfetamina e ecstasy (MDMA) com recurso aos DSS como método de extração mas analisando por LC-MS. No que respeita à área das ciências moleculares, química analítica e bioquímica clínica também foram utilizados DSS para estudos de deteção de *Streptococcus pneumoniae*[76], diagnóstico de diabetes mellitus[77], quantificação de BMS-927711 para tratamento de enxaquecas[63] e medição da atividade enzimática da dihidropirimidina desidrogenase (DPD)[78].

4. Psicofármacos

Os psicofármacos são substâncias que atuam no processo de comunicação química entre neurónios, tendo assim um efeito na alteração do estado psicológico[79]. Dividem-se em 4 subgrupos (antidepressivos, antipsicóticos, ansiolíticos/sedativos e hipnóticos e o lítio) e todos eles têm um papel fundamental em tratar doenças do foro psiquiátrico com sintomas psicóticos, como a esquizofrenia, doenças bipolares, a ansiedade e a depressão. Cada psicofármaco induz alterações lentas nos mecanismos de comunicação e circuitos neuronais, sendo assim o efeito terapêutico variável entre os diferentes psicofármacos. Apesar disto, não existem fármacos específicos para um determinado diagnóstico, isto é, o uso de antidepressivos tanto é eficaz no tratamento de depressões como no tratamento de distúrbios obsessivos compulsivos, ansiedade e ataques de pânico. Na tabela 4 encontram-se resumidos os efeitos de cada psicofármaco a nível neuronal e o seu tempo de ação[79], bem como o prontuário terapêutico de cada um[80].

Tabela 4: Modo de ação e prontuário terapêutico de cada tipo de psicofármacos no sistema neuronal e respetivo tempo de ação no organismo. Adaptado de Cowen[79] e Caramona *et al.*[80]

Grupo fármaco-terapêutico	Modo de ação	Prontuário terapêutico	Tempo de ação
Antidepressivos	Aumentam a ação da noradrenalina e da serotonina, inibindo a sua recaptação	Recomendado para o controlo sintomático das perturbações depressivas do humor; provocam hipotensão ortostática, sedação e efeitos anticolinérgicos	2-4 semanas
Antipsicóticos	Bloqueiam os recetores dopaminérgicos	Eficazes no controlo dos sintomas das psicoses; recomendados em caso de alterações de comportamento, tétano, porfíria, soluços intratáveis, dor neuropática, alergia e prurido; Efeitos adversos resumidos na tabela 5	2-6 semanas
Ansiolíticos, sedativos e hipnóticos (benzodiazepinas)	Aumentam a ação do ácido γ -aminobutírico (GABA)	Recomendado maioritariamente para tratamento da síndrome de ansiedade e/ou indução ou manutenção do sono; Possibilidade de depressão grave do SNC, coma e morte	Efeito imediato
Lítio	Diminui a atividade de sistemas enzimáticos acoplados a recetores	Recomendado para o tratamento e profilaxia da mania, da doença bipolar, depressão recorrente, comportamento agressivo ou automutilante; Alterações gastrointestinais, tremor, poliúria, polidipsia, aumento de peso e edema	2-4 semanas

O consumo de psicofármacos é uma realidade relacionada com a doença mental grave, e em Portugal os padrões de prescrição e consumo destes fármacos tem revelado uma tendência de aumento[81]. De acordo com um estudo realizado pela Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. (INFARMED)[82], entre o ano de

2000 e 2012 verificou-se um aumento da utilização de psicofármacos de todos os subgrupos (gráfico 1), sendo mais evidente o consumo de antidepressivos e antipsicóticos.

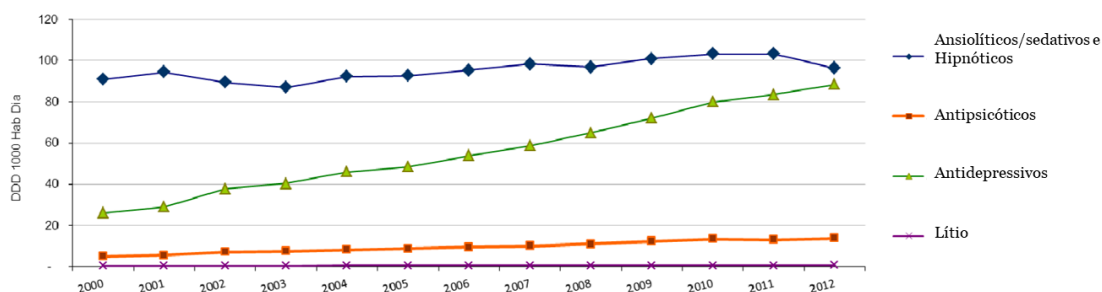


Gráfico 1: Evolução do consumo de psicofármacos em Portugal continental entre 2000 e 2012. Adaptado de [82]

Ao nível dos ansiolíticos, sedativos e hipnóticos, observou-se um aumento de 6% e ao nível dos antidepressivos verificou-se uma taxa de crescimento de 240% no mesmo intervalo de tempo. Relativamente aos antipsicóticos, estes apresentaram uma taxa de crescimento acentuada de 171%. Segundo o relatório “Sem mais tempo a perder - Saúde mental em Portugal: um desafio para a próxima década”[81], entre 2012 e 2018 o consumo de psicofármacos continuou a aumentar (gráfico 2).

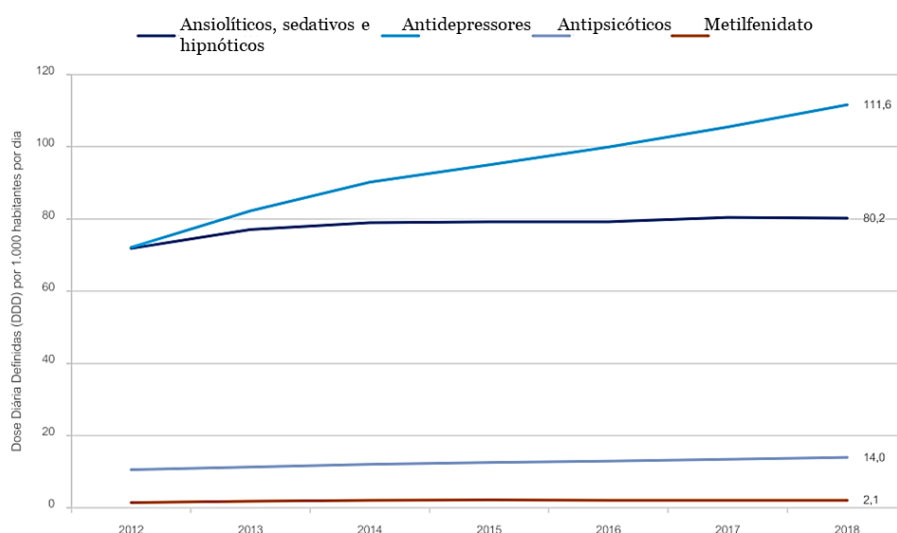


Gráfico 2: Evolução do consumo de psicofármacos em Portugal continental entre 2012 e 2018. Adaptado de [81]

4.1. Antipsicóticos

Os antipsicóticos são usados principalmente para o tratamento da esquizofrenia, mas também são usados no tratamento de outras doenças psiquiátricas com sintomas

psicóticos, como a depressão, distúrbios de ansiedade, distúrbios bipolares, entre outros. Têm como objetivo diminuir a intensidade das alucinações, delírios e a agitação psicomotora destas psicoses, podendo ainda ser usados profilaticamente para prevenir recaídas do tratamento da esquizofrenia[79, 83]. Estes fármacos podem ser classificados em antipsicóticos de primeira geração (APG), ou típicos, convencionais, clássicos ou neurolépticos, e antipsicóticos de segunda geração (ASG), ou atípicos[84]. A principal diferença entre estas duas classes prende-se, maioritariamente, com a afinidade do fármaco para certos recetores e os efeitos adversos indesejados por eles produzidos[83]. O seu mecanismo de ação varia consoante o tipo de perturbação a ser tratada. Assim, enquanto que os antipsicóticos típicos atuam sobretudo no bloqueio dos recetores D2, os antipsicóticos atípicos atuam maioritariamente no bloqueio dos recetores serotoninérgicos 5-HT_{2A}. Apesar disto, ambos têm a capacidade de bloquear os dois tipos de recetores[83, 85].

Segundo os relatórios da INFARMED[82] e “Sem mais tempo a perder - Saúde mental em Portugal: um desafio para a próxima década”[81] entre 2000 e 2018 verificou-se um aumento no consumo dos antipsicóticos (gráficos 1 e 2), apesar destes psicofármacos apresentarem um baixo nível de consumo comparativamente com os outros grupos.

4.1.1. Efeitos adversos dos antipsicóticos

Os doentes com psicoses que necessitem de medicação antipsicótica sofrem de vários problemas adicionais devido ao estilo de vida que possuem, bem como à negligência relativamente aos cuidados pessoais, tratamento de doenças físicas e aos efeitos adversos da medicação[86]. Todos os antipsicóticos estão associados a efeitos secundários, no entanto a especificidade de cada fármaco e o seu impacto clínico varia entre indivíduos e consoante os fármacos[84].

De um modo geral, os APG causam frequentemente efeitos extrapiramidais e danificam mais a capacidade cognitiva, por isso, introduziram-se nos anos 90 os ASG, na esperança de que estes fármacos tivessem um menor impacto na aprendizagem. Os ASG têm uma menor capacidade de causar efeitos extrapiramidais e conseguem melhorar a capacidade cognitiva em pacientes com esquizofrenia, no entanto têm maior capacidade para causar efeitos metabólicos adversos[87, 88]. Como já referido, os antipsicóticos atípicos atuam principalmente nos recetores serotoninérgicos 5-HT_{2A}, sendo que os mesmos têm a capacidade de inibir a libertação de dopamina, quando estimulados, pelo que o seu bloqueio conduz ao aumento dos níveis de dopamina. O aumento de dopamina atua na via mesocortical e induz uma melhoria nos

sintomas negativos da esquizofrenia, o que representa uma enorme vantagem destes fármacos relativamente aos antipsicóticos de primeira geração[85].

Tanto os APG como os ASG têm a capacidade de bloquear outros recetores, nomeadamente os muscarínicos, os α -adrenérgicos e os histamínicos, originando assim outros efeitos adversos secundários, que se encontram resumidos na tabela 5[85].

Tabela 5: Efeitos adversos provocados pelos fármacos antipsicóticos [85, 89, 90].

Extrapiramidais (Mais associados aos APG)
Acatísia
Distonia aguda
Parkinsonismo
Discenésia tardia
Metabólicos (Mais associados aos ASG)
Aumento do apetite
Aumento de peso
Dislipidémia
Resistência à insulina
Elevado risco de desenvolver síndrome metabólica
Outros
Hiperprolactinémia (causando amenorreia, galactorreia e disfunção sexual)
Cardiovasculares (Acidente Vascular Cerebral (AVC), miocardite, cardiomiopatia, hipotensão ortostática, taquicardia, eletrocardiograma (ECG) com prolongamento do intervalo QT)
Sedação
Convulsões
Tonturas
Efeitos anticolinérgicos (visão turva, xerostomia, aumento da pressão intraocular, xeroftalmia, obstipação e retenção urinária)
Défices cognitivos
Pulmonares (falha respiratória aguda, pneumonia, apneia do sono)
Agravamento do glaucoma de ângulo fechado
Síndrome neuroléptica maligna
Endócrinos

4.1.2 Monitorização terapêutica

As psicoses são doenças de natureza crónica, que apresentam recaídas e remissões ao longo da vida dos indivíduos[91]. A escolha do fármaco antipsicótico para a continuação do tratamento depende de fatores como o quadro clínico do doente, antecedentes pessoais, tolerabilidade do indivíduo, idade, a evidência científica sobre a eficácia do fármaco e o seu potencial para causar efeitos extrapiramidais. Também as

respostas manifestadas pelo doente a fármacos antipsicóticos usados no passado são importantes para a escolha do fármaco[84, 85].

Segundo a norma da Direção Geral de Saúde[84] a medicação antipsicótica apenas deve ser recomendada para situações clínicas em que se verifique a sua eficácia. Aquando do aparecimento do primeiro surto/episódio psicótico é recomendada a prescrição de um antipsicótico por via oral. Este tratamento deve ser iniciado com doses mínimas para lentamente se titularem as doses eficazes[84].

A monitorização terapêutica é um dos instrumentos mais valiosos de que se dispõe atualmente para assegurar a máxima eficácia terapêutica com a mínima incidência dos efeitos adversos, em caso de tratamentos prolongados[92]. No caso dos antipsicóticos, a monitorização deve ser feita numa dosagem otimizada durante quatro a seis semanas e deve ser registada regularmente durante este período e durante o tratamento. Durante o controlo da medicação, deve dar-se especial atenção à adesão, à terapêutica e eficácia do tratamento, às alterações de comportamentos e sintomas do doente e ao aparecimento de efeitos secundários. Devem-se ainda realizar análises laboratoriais regularmente, de modo a avaliar os parâmetros biológicos do doente.

No caso do tratamento da manutenção da esquizofrenia e outras perturbações psicóticas, para evitar o agravamento de sintomas e promover a recuperação do doente, os sinais e sintomas manifestados por este devem ser monitorizados por um período de, pelo menos, dois anos, devendo ainda ser informado que durante este período existe um elevado risco de ocorrência de recaídas após a paragem do tratamento. No caso de haver a suspensão definitiva do tratamento com antipsicóticos, os sinais e sintomas de exacerbação deverão continuar a ser controlados.

No caso de doentes que não respondam ao tratamento antipsicótico, deve ser reavaliado o seu diagnóstico através da verificação da adesão à terapêutica, confirmação da dose e o período de tempo adequados e verificação do uso de outras substâncias ou medicação simultaneamente com a medicação antipsicótica bem como a existência de outras comorbilidades[84].

Capítulo 2-Justificação do tema e objetivos

Segundo os dados obtidos pela Direção Geral da Saúde, o consumo de fármacos antipsicóticos em Portugal tem aumentado nas últimas duas décadas. Este grupo de psicofármacos é maioritariamente usado para o tratamento da esquizofrenia, no entanto são também usados para o tratamento de outras doenças psiquiátricas com sintomas psicóticos.

Em contexto analítico clínico ou forense, conhecer a estabilidade dos fármacos em amostras biológicas é de extrema importância, pois, por vezes, estas demoram vários dias a chegar aos laboratórios para análise, como é o caso daquelas amostras que são enviadas por correio, ou quando por questões burocráticas ou mesmo de volume de trabalho no laboratório não é possível analisar as amostras no momento. Assim, aquando da quantificação das substâncias presentes nas amostras, estas podem apresentar desvios da sua concentração inicial, o que pode gerar interpretações erradas.

O estudo da estabilidade de fármacos em amostras biológicas tem o objetivo de avaliar o seu comportamento em diferentes matrizes, que posteriormente são armazenadas a diversas condições, de modo a tentar definir as melhores condições de armazenamento que permitam uma menor degradação dos analitos.

Segundo a literatura, existem poucos trabalhos onde a estabilidade de antipsicóticos é estudada, sendo que, na matriz de fluido oral, que é uma matriz que apresenta imensas vantagens, não existem estudos de estabilidade a longo prazo.

Portanto, como os DSS são considerados uma boa forma de armazenamento de amostras e que melhora a estabilidade dos analitos, no presente trabalho é proposto avaliar a estabilidade a longo prazo dos fármacos antipsicóticos clorpromazina, levomepromazina, ciamemazina, clozapina, quetiapina e haloperidol. Para tal, serão adicionados conservantes ao fluido oral fortificado com os fármacos, que será aplicado em DSS, sendo estes armazenados sob diversas condições. Para a análise da estabilidade dos antipsicóticos recorrer-se-á à GC-MS/MS.

Capítulo 3-Procedimento experimental

1. Materiais e métodos

1.1 Reagentes

Padrões analíticos de clorpromazina (CPZ), haloperidol (HAL) e clozapina (CLZ) foram adquiridos à LGC PRomochem (Barcelona, Espanha) na concentração de 1 mg/mL. A promazina (PRZ), a levomepromazina (LVP) e a ciamemazina (CYA) foram adquiridos à Sigma Aldrich (Lisboa, Portugal). A Quetiapina (QTP) foi gentilmente oferecida por AstraZeneca PLC (Londres, Reino Unido). O N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) e o trimetilclorosilano (TMCS) foram adquiridos na Macherey-Nagel (Düren, Alemanha). Os *Whatman™ 903 protein saver cards* foram adquiridos à Solítica (Lisboa, Portugal). O ácido ascórbico foi adquirido à Fisher Scientific (UK), o fluoreto de sódio foi adquirido à Sigma Aldrich (Sintra, Portugal) e a azida de sódio à Panreac Química SA (Barcelona, Espanha). Todos os padrões analíticos e o padrão interno foram armazenados a -20°C.

Devido aos bons resultados obtidos para a olanzapina no estudo de Fisher *et al.*[52] com o ácido ascórbico como conservante no fluido oral, este foi um dos conservante escolhidos para realizar o estudo. Os outros 2 conservantes escolhidos, foram o fluoreto de sódio e a azida de sódio, uma vez que segundo Stoykova *et al.*[27] o fluido oral armazenado com estes conservantes, quando comparado ao fluido oral armazenado sem conservante a 4°C, apresentava menos perdas de creatinina que as outras amostras armazenadas com outros conservantes.

Foi preparada uma mistura metanólica de todos os analitos em estudo à concentração de 10 µg/mL, exceto para o HAL que se encontrava à concentração de 2 µg/mL. A concentração do padrão interno PRZ foi de 0,5 µg/mL em metanol. Dado que este fármaco antipsicótico não está comercialmente disponível em Portugal, é pouco provável encontrá-lo nas amostras reais de pacientes. Adicionalmente, por pertencer à mesma classe dos compostos em estudo, a PRZ apresenta uma estrutura semelhante aos mesmos esperando-se como tal um comportamento cromatográfico semelhante. Por estes motivos foi escolhida esta substância para ser usada como padrão interno.

1.2 Condições cromatográficas e espetrométricas

As análises cromatográficas foram realizadas com um sistema de cromatografia gasosa HP 7890A equipado com um detetor de espetrometria de massa triplo quadrupolo (modelo 7000B), ambos da Agilent technologies (Waldbronn, Alemanha), um

amostrador MPS2 e um injetor PTV da Gerstel (Mülheim na der Ruhr, Alemanha). A separação dos antipsicóticos foi feita por uma coluna capilar (30 m x 0,25 mm ID, 0,25 μ m) com 5% de fenilmetilsiloxano (HP-5MS) fornecido por J & W Scientific (Folsom, USA). O fluxo de hélio, utilizado como gás de arraste, foi de 0,8 mL/min. A temperatura inicial do forno foi de 120°C, temperatura que se manteve durante 2 min, tendo depois aumentado a 20°C/min até alcançar os 300°C. Esta temperatura foi mantida durante 14 minutos. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 25 min. A temperatura do injetor foi de 250°C e as injeções decorreram em modo *splitless*.

Relativamente ao espectrómetro de massa, o fluxo estabelecido para o azoto na célula de colisão foi de 2,5 mL/min, com uma corrente de trabalho de 35 μ A e uma energia de 70 eV. Os dados foram adquiridos no modo de monitorização de reações múltiplas (MRM) usando o *software* MassHunter WorkStation rev.B.02.01 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha).

1.3 Amostras

As amostras de fluido oral, livres de fármacos, para a realização do presente trabalho foram fornecidas pelos membros do laboratório e armazenadas a 4°C. Procedeu-se à preparação de uma *pool* com fluido oral de pelo menos 5 indivíduos diferentes. Antes da aplicação da amostra aos DSS procedeu-se à centrifugação a 3500 rpm durante 5 minutos.

1.3.1 Preparação das amostras

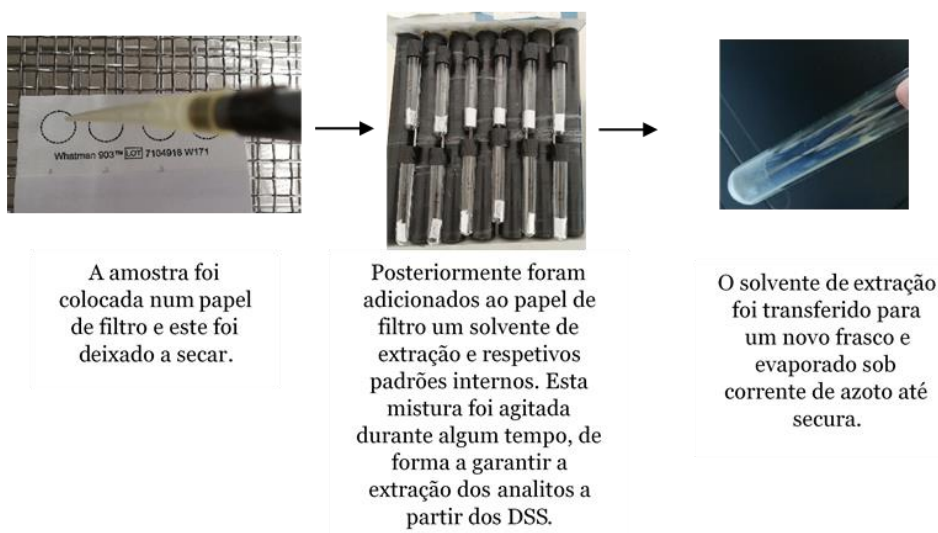


Figura 5: Representação esquemática do procedimento de DSS.

Fortificaram-se, em separado, várias amostras de fluido oral com uma concentração de 200 ng/mL de CPZ, LVP, CLZ, QTP e CYA e 40 ng/mL de HAL e com as seguintes concentrações de conservantes: 300 ng/mL e 600 ng/mL de ácido ascórbico, 1% e 2% de fluoreto de sódio e 0,1% e 0,2% de azida de sódio. Retiraram-se 50µL de cada uma destas misturas e aplicaram-se aos *Whatman™ 903 protein saver cards* (cartões usados para os DSS) que foram deixados a secar a diferentes condições de armazenamento, isto é, com ou sem luz, a 4°C ou 25°C e durante 1 ou 7 dias. Após este tempo, recortaram-se os DSS e foram colocados em diferentes tubos de vidro com 2 mL do solvente de extração (metanol acidificado, pH=5 [54]) e 25 µL do padrão interno PRZ. Para proceder à extração das amostras dos DSS, colocaram-se os tubos durante 5 minutos num agitador de rolos a 70 rpm e posteriormente as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 3500 rpm. A solução sobrenadante foi evaporada sob corrente de azoto até secar e, posteriormente, foram adicionados 50 µL da mistura MSTFA com 5% de TMCS tendo-se procedido à derivatização por micro-ondas (800 W) durante 2 minutos.

1.4 Desenho experimental

O desenho experimental (DoE do inglês *Design of Experiments*) é uma ferramenta estatística, que permite delinear um procedimento experimental com vários fatores, de modo a identificar o efeito de cada um e a interação entre dois ou mais fatores nas amostras em estudo[93]. Com esta abordagem multivariada é possível eliminar fatores com pouca ou nenhuma influência significativa nos resultados, de modo a minimizar o número de experiências realizadas, economizando tempo e dinheiro. Com uma abordagem univariada (estudo dos vários fatores isoladamente) este processo não seria possível[94]. Posto isto, é possível otimizar as condições em estudo e obter os melhores resultados[93, 94]. No presente trabalho foi aplicada a ferramenta de DoE para gerar várias hipóteses de diferentes condições de armazenamento e assim otimizar o processo de avaliação da estabilidade dos analitos a longo prazo, recorrendo à técnica de DSS para preparação, pré-tratamento e armazenamento das amostras.

Na tabela 6 encontra-se a matriz do DoE com as condições a que as amostras foram sujeitas, sendo que os fatores em estudo foram a temperatura de armazenamento (25°C ou 4°C), a presença ou ausência de luz, a concentração de conservante usada em cada amostra (alta ou baixa) e o tempo de armazenamento das amostras (1 ou 7 dias). Esta matriz foi realizada através do software MINITAB®, versão 17. Foi realizado um planeamento fatorial de 2⁴ fatores.

Tabela 6: Matriz com as variáveis para a realização do DoE.

Ordem da experiência	Temperatura de armazenamento	Luz	Concentração de conservante	Tempo de armazenamento
1	4°C	Presença	Baixa	1 Dia
2	4°C	Presença	Baixa	7 Dias
3	4°C	Presença	Alta	7 Dias
4	4°C	Ausência	Baixa	1 Dia
5	25°C	Presença	Alta	7 Dias
6	25°C	Ausência	Baixa	7 Dias
7	25°C	Ausência	Alta	7 Dias
8	25°C	Ausência	Baixa	1 Dia
9	4°C	Ausência	Alta	7 Dias
10	25°C	Ausência	Alta	1 Dia
11	25°C	Presença	Baixa	7 Dias
12	4°C	Ausência	Baixa	7 Dias
13	25°C	Presença	Alta	1 Dia
14	4°C	Presença	Alta	1 Dia
15	25°C	Presença	Baixa	1 Dia
16	4°C	Ausência	Alta	1 Dia

Cada linha da matriz representa uma execução experimental.

2. Resultados e discussão

2.1 Otimização das condições espectrométricas

Para ser possível a visualização dos analitos em estudo após as condições cromatográficas estarem definidas, foram injetados os padrões puros dos analitos no modo de scan (m/z 50-550) identificando assim os íões que caracterizavam cada composto. Posteriormente, no modo de *Product Ion* (PI) os íões escolhidos (“íões pai”) foram sujeitos a fragmentação sob diferentes energias de colisão (5, 10, 15 e 20 eV), originando os “íões filho”. Para uma melhor detecção, os compostos foram analisados em MRM, ou seja, foram usadas as transições de íões pai para íões filho, as quais permitem identificar inequivocamente os sinais cromatográficos dos compostos a analisar. Foram usadas duas transições: uma quantificadora, que permite quantificar os analitos, e uma qualificadora, que permite verificar se o sinal cromatográfico obtido corresponde ao analito em estudo.

Com a análise por MRM existem menos interferências durante a eluição dos compostos, sendo a sua identificação mais fiável e com maior sensibilidade[55].

A título de exemplo, na figura 6 e 7 encontram-se os espectros de massa obtidos no modo de *scan* da LVP e da CPZ, na figura 8 e 9 encontram-se os espectros com os íões originados da fragmentação.

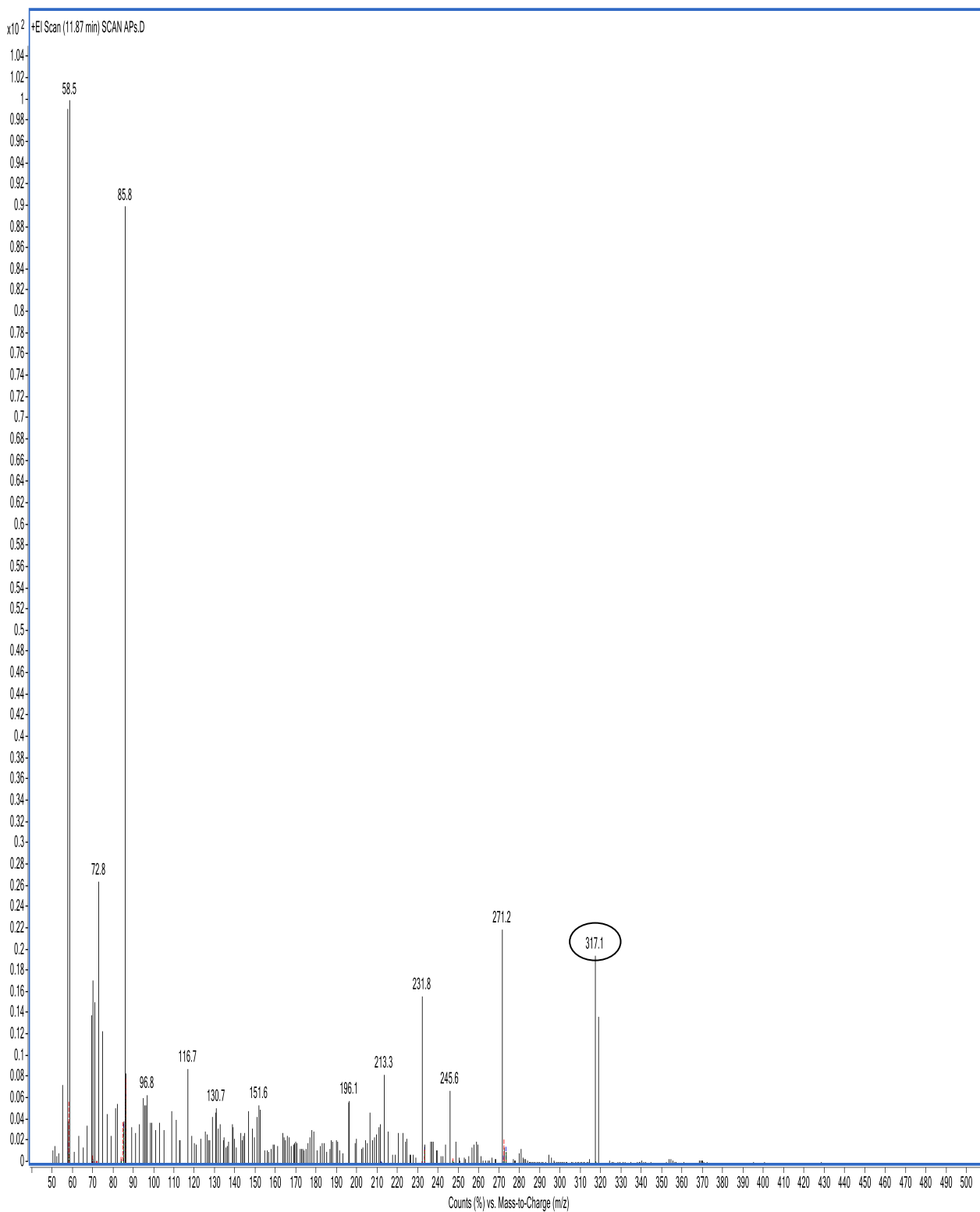


Figura 6: Espectro de massa obtido no modo de scan da CPZ a uma concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$.

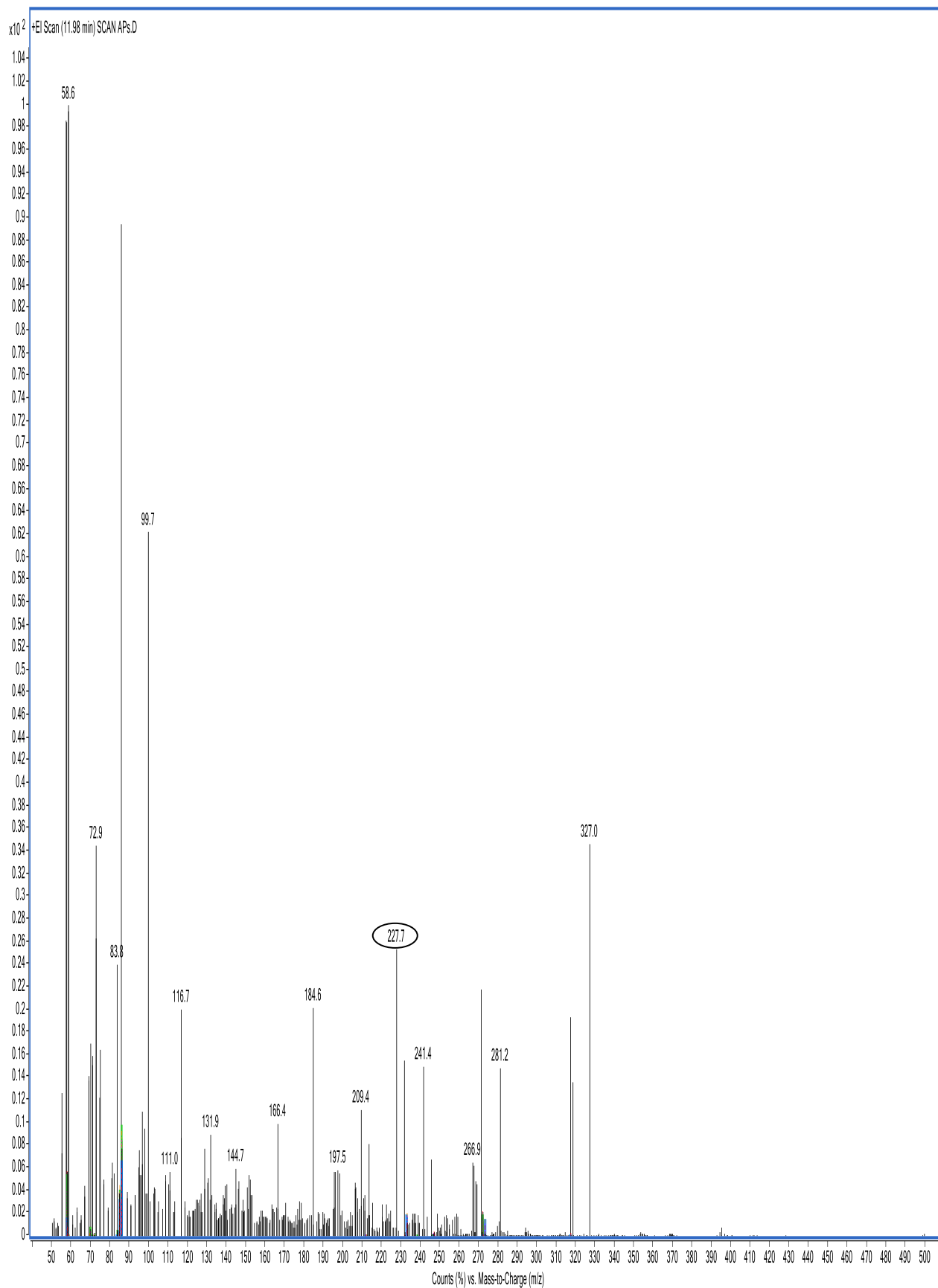


Figura 7: Espectro de massa obtido no modo de scan da LVP a uma concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$.

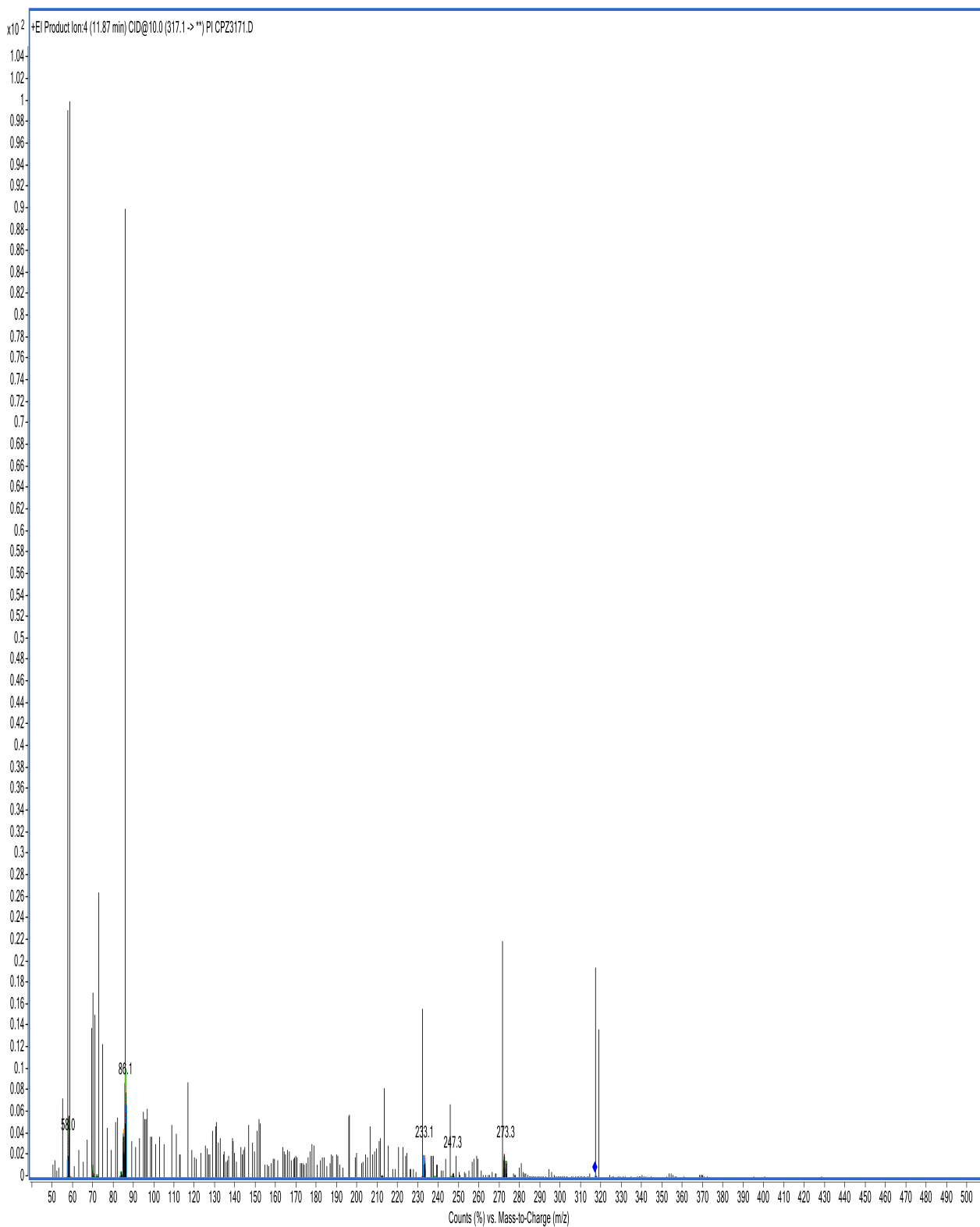


Figura 8: Espectro de massa com os iões originados pela fragmentação do ião 317,1 da CPZ a uma concentração de 5 µg/mL.

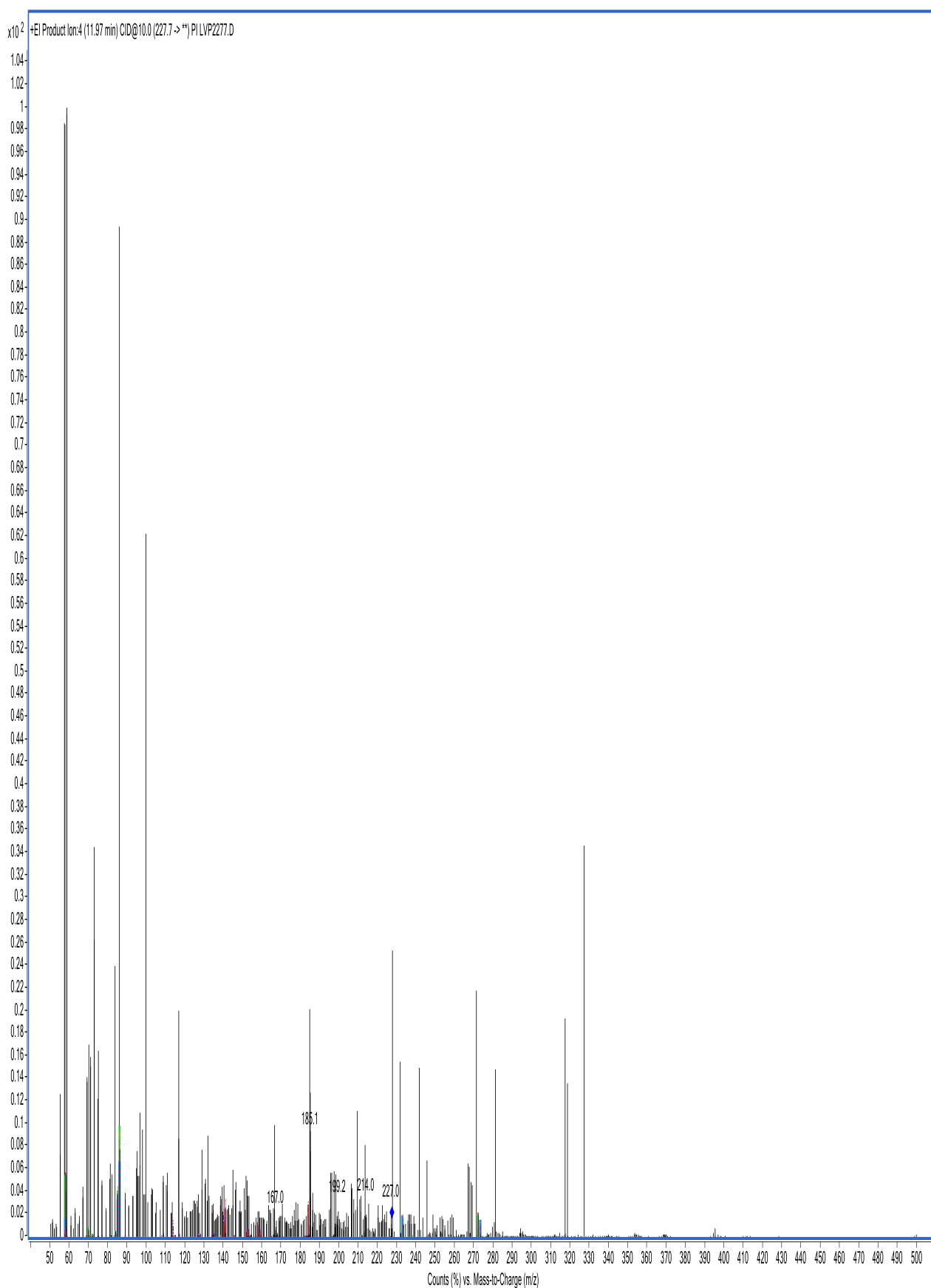


Figura 9: Espetro de massa com os iões originados pela fragmentação do ião 227,7 da LVP a uma concentração de 5 µg/mL.

Conforme as condições anteriormente descritas, na tabela 7 encontram-se as condições usadas em modo de MRM para detecção dos analitos de interesse, isto é, as transições, os tempos de retenção, as energias de colisão e o *dwell time* (tempo de aquisição do analito com uma determinada massa/carga). Na figura 10 encontra-se um cromatograma obtido desses mesmos analitos à concentração de 200 ng/mL para a CPZ, LVP, CLZ, CYA e QTP e 40 ng/mL para o HAL.

Tabela 7: Parâmetros do modo MRM no GC-MS/MS para detecção dos analitos em estudo.

Analitos	Tempo de retenção	Transições (m/z)	Energia de Colisão	Dwell Time
PRZ*	11.12	283.1 -> 238.2	15	50
CPZ	11.90	317.1 -> 233.1	15	50
		317.1 -> 272.1	20	50
LVP	11.97	227.7 -> 185.1	20	50
		184.5 -> 141.1	15	50
CYA	12.36	321.9 -> 278.4	10	50
		321.9 -> 100,0	10	50
CLZ	14.24	325.6 -> 243.0	10	50
		325.6 -> 270.3	20	50
HAL	14.91	297.9 -> 297.3	5	50
		297.9 -> 73.3	20	50
QTP	18.90	209.3 -> 139.0	20	50
		209.3 -> 183.3	15	50

(*padrão interno; a negrito encontram-se as transições quantitativas)



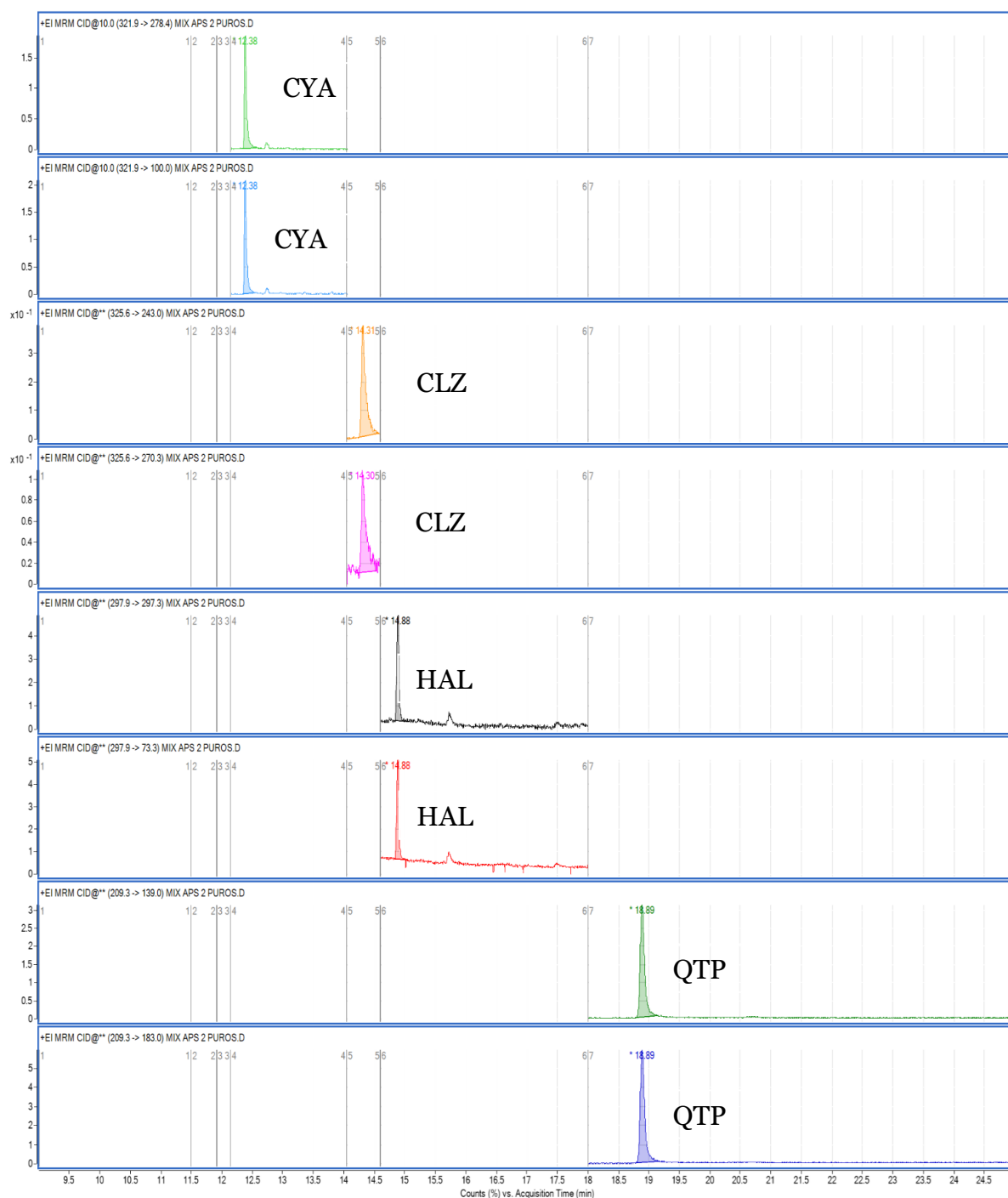


Figura 10: Cromatograma relativo aos analitos em estudo à concentração de 200 ng/mL para a CPZ, LVP, CLZ, QTP e CYA e 40 ng/mL para o HAL.

2.2 Resultados obtidos do DoE

Através do cálculo da razão entre a área absoluta de cada analito e do padrão interno, obtiveram-se os valores presentes nas tabelas 8, 9 e 10 que posteriormente, ao serem inseridos no MINITAB®, originaram os gráficos de pareto, os gráficos dos efeitos principais e os gráficos das interações entre fatores de cada analito para cada conservante.

Nos gráficos de Pareto encontram-se representados por ordem decrescente os fatores que afetam os resultados obtidos, e apenas aqueles que ultrapassam a linha do nível de significância de 5% são considerados estatisticamente significativos, isto é, que influenciam a resposta final obtida. Os gráficos dos efeitos principais demonstram a condição que mais influencia a resposta final obtida, dentro de cada fator. Nestes gráficos, se as linhas que interligam as 2 condições (do mesmo fator) forem paralelas ao eixo das abscissas, significa que não existe uma condição predominante, no entanto se as linhas apresentarem declive, significa que uma das condições predomina sobre a outra. Isto leva a que a condição predominante afete maioritariamente a resposta do analito. Nestes gráficos cada ponto representa a média dos valores obtidos na tabela para aquela condição. Os gráficos das interações entre fatores são importantes para a interpretação de interações significativas que possam existir entre dois fatores. Assim, é possível determinar as condições que geram melhor resposta conjugando os dois fatores em análise, sendo que apenas afetam a resposta final se as variáveis forem significativas, pois por vezes existem interações entre fatores, mas estes não são significativos. Adicionalmente, se as linhas que representam os dois fatores em análise forem paralelas, significa que não existe nenhuma interação entre os fatores. Posto isto, estes gráficos não devem ser analisados isoladamente, pois por vezes apresentam uma aparência que pode induzir em erro.

Estes três tipos de gráficos, originados pelo MINITAB®, ao serem simultaneamente analisados permitem verificar as condições ideais para o estudo.

2.2.1 Ácido ascórbico

O ácido ascórbico foi o primeiro conservante usado para fazer o estudo. Na tabela 8 encontram-se os resultados obtidos para o ácido ascórbico perante as várias condições de armazenamento.

Tabela 8: Resultados obtidos através do cálculo do rácio entre os sinais dos analitos e o sinal do padrão interno para o conservante ácido ascórbico.

Ordem da exp.	Condições				Analitos					
	Temp. (°C)	Luz	Conc. (ng/mL)	Tempo (Dias)	CPZ	LVP	CYA	CLZ	HAL	QTP
1	4	P	300	1	0,078	1,372	0,060	0,065	0,097	0,210
2	4	P	300	7	0,064	1,082	0,068	0,103	0,128	0,470
3	4	P	600	7	0,045	0,668	0,054	0,075	0,205	0,281
4	4	A	300	1	0,096	1,772	0,096	0,131	0,140	0,522
5	25	P	600	7	0,011	0,368	0,040	0,024	0,582	0,196
6	25	A	300	7	0,103	1,785	0,100	0,176	0,219	0,776
7	25	A	600	7	0,077	1,053	0,079	0,035	0,508	0,459
8	25	A	300	1	0,080	1,684	0,083	0,085	0,090	0,351
9	4	A	600	7	0,067	1,129	0,059	0,082	0,139	0,283
10	25	A	600	1	0,063	1,038	0,054	0,015	0,047	0,120
11	25	P	300	7	0,024	0,462	0,032	0,026	0,109	0,174
12	4	A	300	7	0,094	1,806	0,103	0,154	0,363	0,699
13	25	P	600	1	0,054	1,045	0,052	0,071	0,067	0,293
14	4	P	600	1	0,064	1,119	0,057	0,056	0,077	0,157
15	25	P	300	1	0,061	1,061	0,065	0,084	0,110	0,434
16	4	A	600	1	0,061	1,229	0,054	0,054	0,047	0,150

Exp.-Experiência; Temp.-Temperatura; P-Presença; A-Ausência; Conc.-Concentração

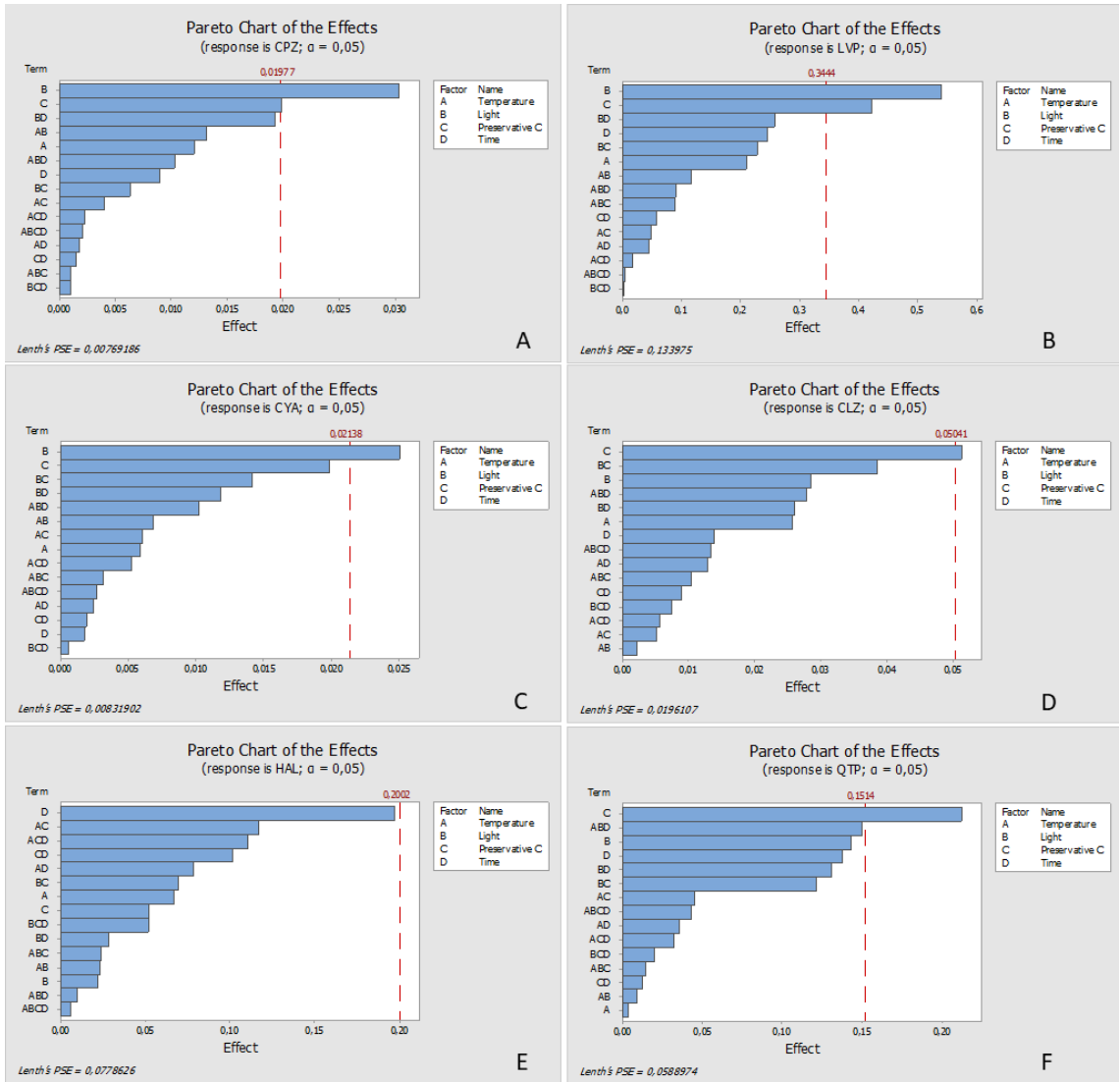


Figura 11: Gráficos de Pareto obtidos com demonstração da influência de cada fator e interação de fatores para cada composto individualmente com ácido ascórbico. A-CPZ, B-LVP, C-CYA, D-CLZ, E-HAL, F-QTP

Através da análise dos gráficos de pareto é possível observar que para todos os analitos, exceto para o HAL, existe sempre pelo menos 1 fator com significância estatística. Estes fatores são o efeito da luz (para a CPZ, LVP e CYA) e a concentração de ácido ascórbico (para a CPZ, LVP, CLZ e QTP). O HAL é o único composto que não tem nenhuma variável estatisticamente significativa, no entanto, como podemos observar na Figura 11 (E) o tempo de secagem das amostras é o parâmetro que mais se aproxima a linha de significância estatística.

Apesar dos resultados obtidos, apenas com estes gráficos não é possível retirar uma conclusão, visto que dentro de cada variável existem 2 condições a serem examinadas. Com a análise dos gráficos dos efeitos principais (gráficos 3-8) é possível reforçar estas interpretações e determinar as melhores condições que conferem a cada analito uma maior resposta.

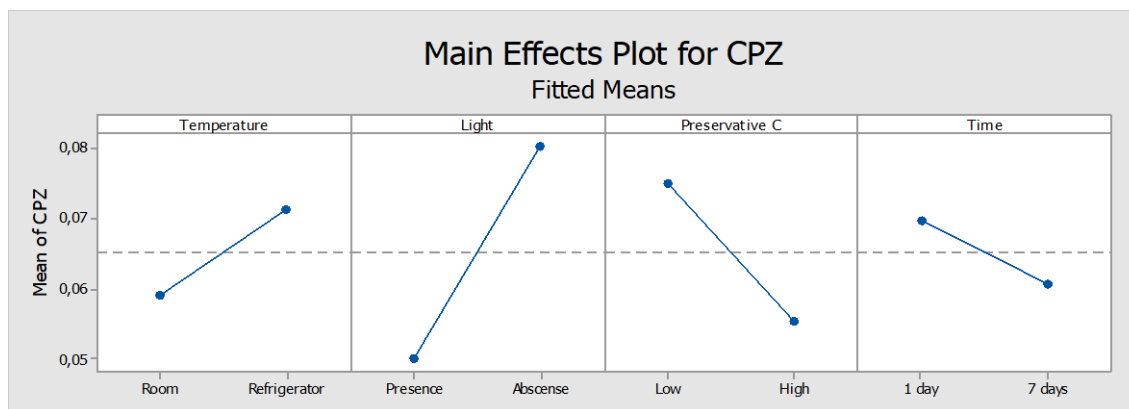


Gráfico 3: Efeitos principais na CPZ com ácido ascórbico.

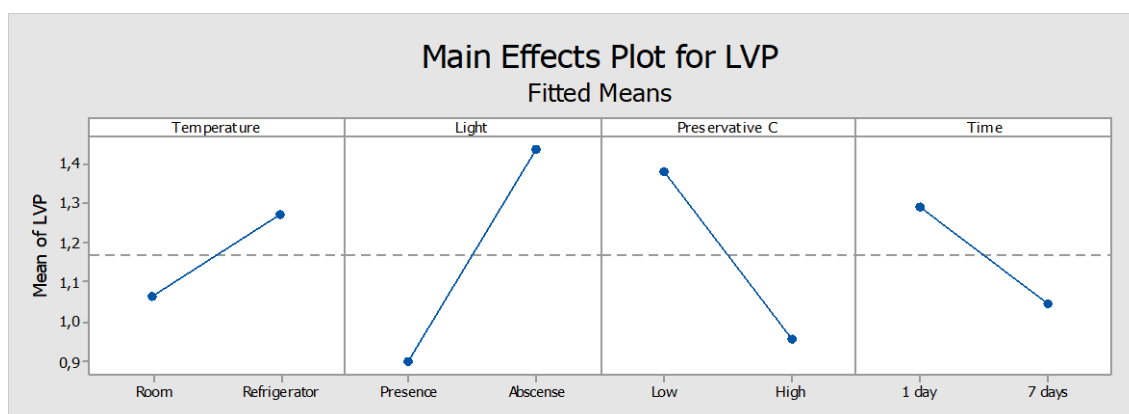


Gráfico 4: Efeitos principais na LVP com ácido ascórbico.

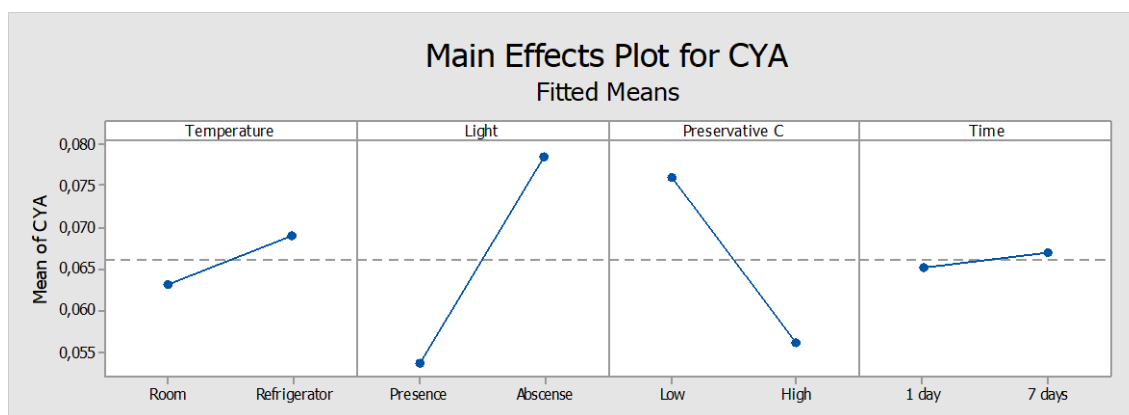


Gráfico 5: Efeitos principais na CYA com ácido ascórbico.

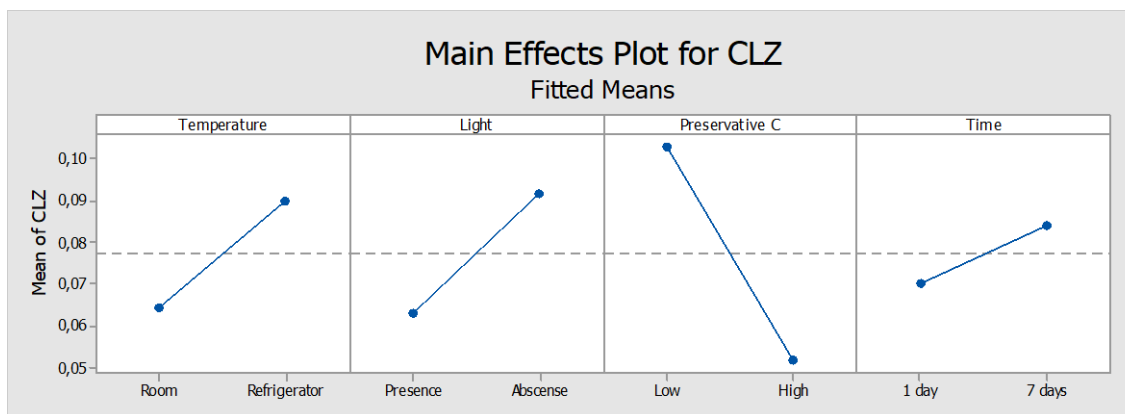


Gráfico 6: Efeitos principais na CLZ com ácido ascórbico.

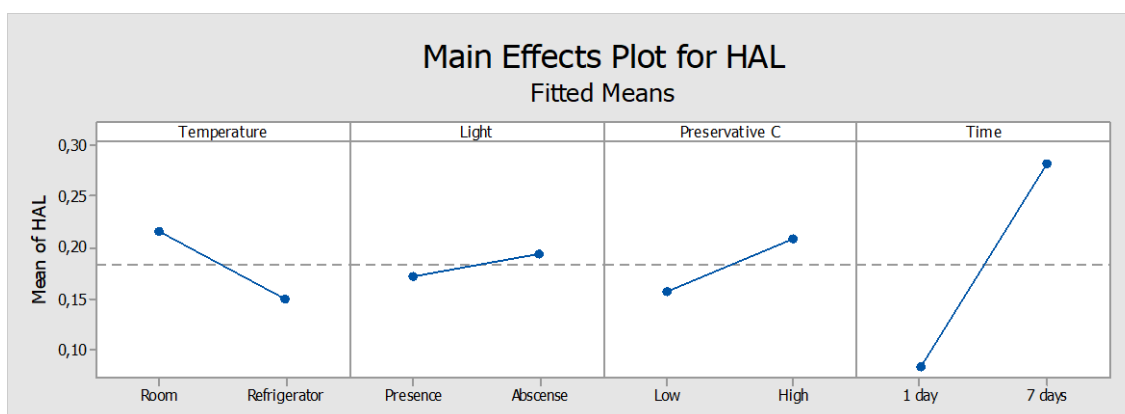


Gráfico 7: Efeitos principais no HAL com ácido ascórbico.

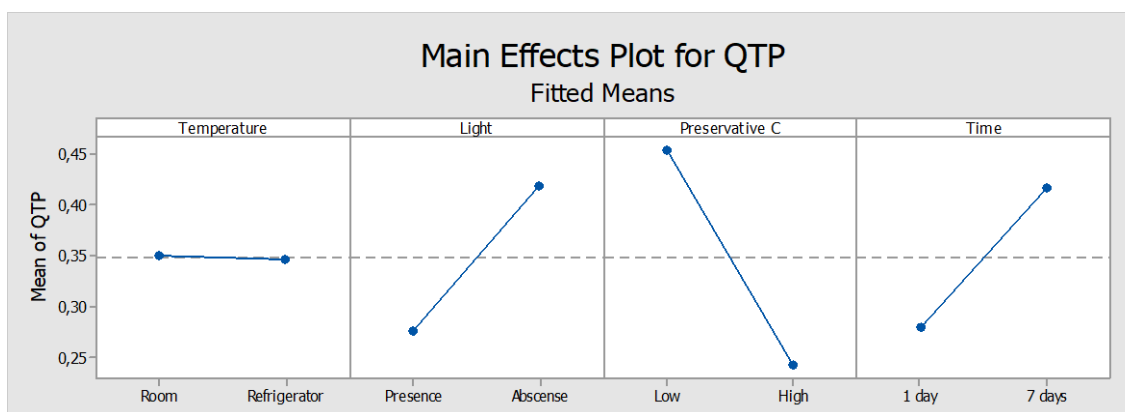


Gráfico 8: Efeitos principais na QTP com ácido ascórbico.

Com a observação dos gráficos dos efeitos principais, é possível determinar as melhores condições de cada variável para cada analito. Tendo apenas em conta estes gráficos, observa-se que para quatro dos seis analitos (CPZ, LVP, CLZ e CYA) a resposta obtida é melhor quando estes são armazenados a 4°C, sendo que para a QTP a temperatura de armazenamento não é relevante, e o HAL tem melhor resposta quando armazenado à temperatura ambiente. Todos os analitos têm uma maior resposta quando são

armazenados na ausência de luz e com baixa concentração de ácido ascórbico. Por outro lado, apenas o HAL possui maior resposta se for armazenado com elevadas concentrações de ácido ascórbico. Relativamente ao tempo de armazenamento, apenas dois dos seis analitos (CPZ e LVP) têm uma maior resposta após o primeiro dia de armazenamento.

No geral, verificou-se que os analitos presentes nas amostras de fluido oral, quando armazenados a 4°C, na ausência de luz e com baixa concentração de ácido ascórbico têm melhores respostas, observando-se que a concentração de conservante é significativa para a CPZ, LVP, CLZ e QTP e o efeito da luz é significativo na CPZ, LVP e CYA. A temperatura, por sua vez, não é um parâmetro significativo para nenhum dos analitos, pelo que não influencia as respostas.

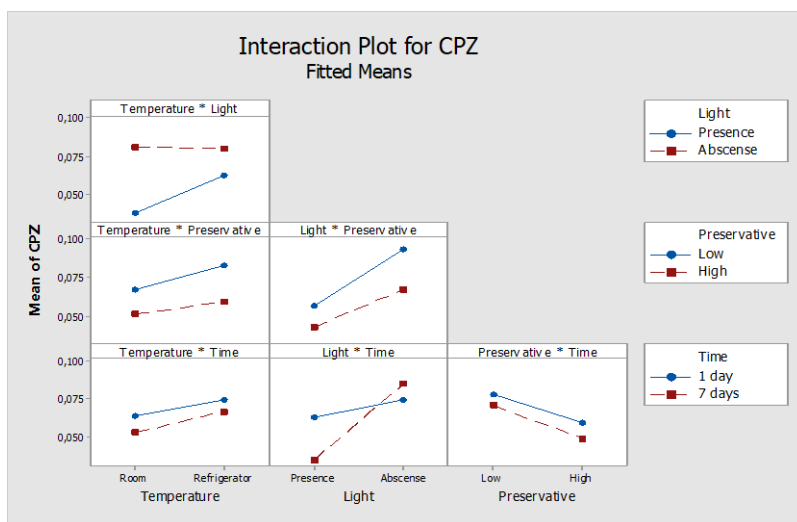


Gráfico 9: Interações de vários fatores para a CPZ com ácido ascórbico.

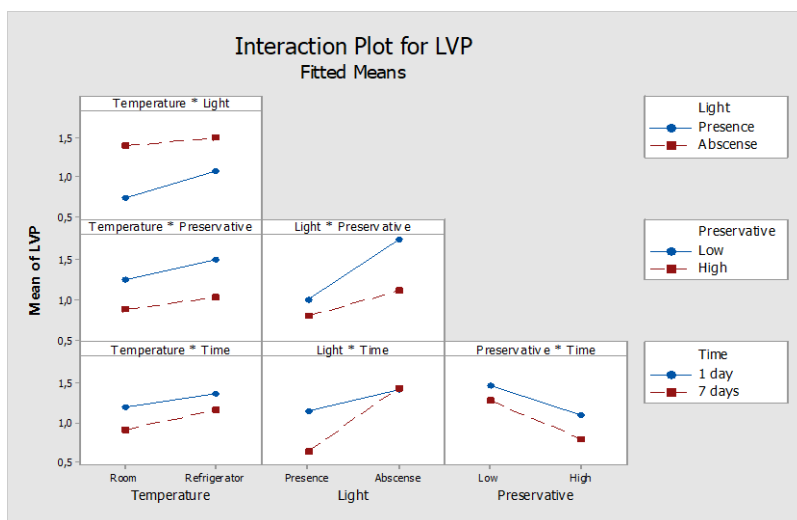


Gráfico 10: Interações de vários fatores para a LVP com ácido ascórbico.

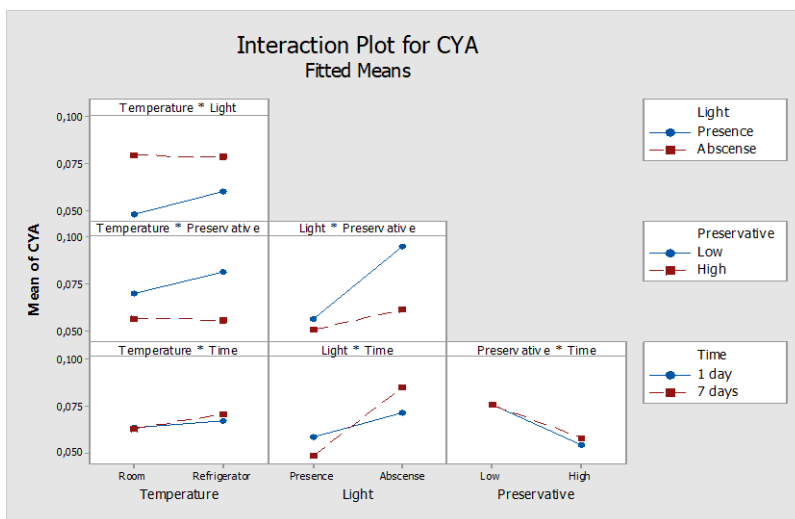


Gráfico 11: Interações de vários fatores para a CYA com ácido ascórbico.

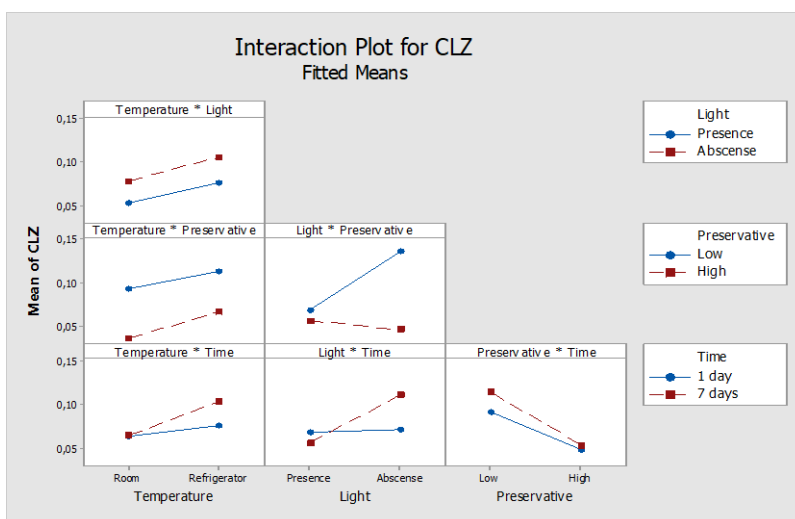


Gráfico 12: Interações de vários fatores para a CLZ com ácido ascórbico.

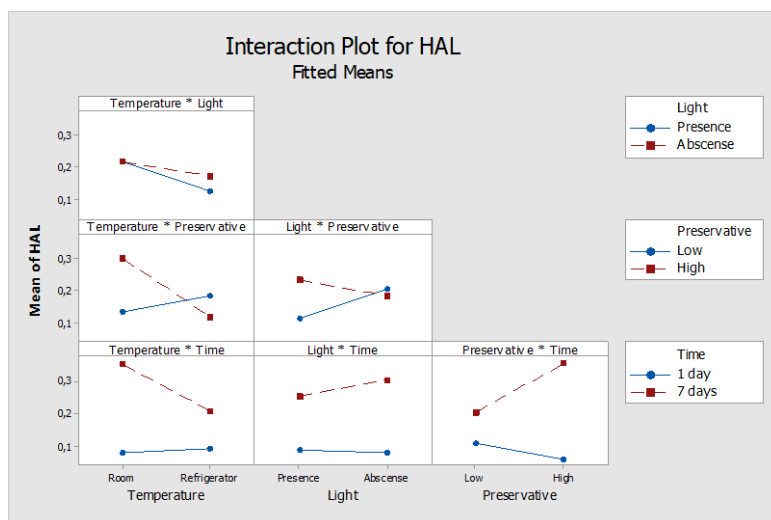


Gráfico 13: Interações de vários fatores para o HAL com ácido ascórbico.

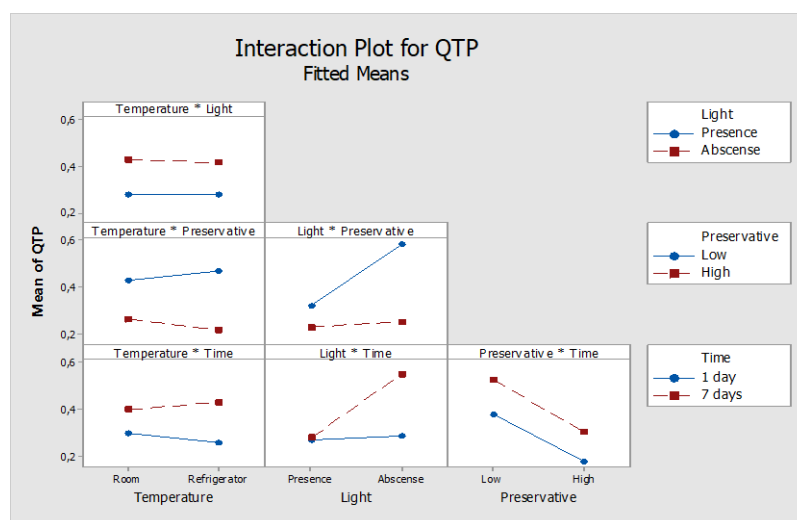


Gráfico 14: Interações de vários fatores para a QTP com ácido ascórbico.

Por observação dos gráficos das interações entre fatores podemos reforçar a ideia de que, como observado nos paretos, não existem interações significativas entre dois dos fatores em estudo para nenhum dos analitos, apesar de existirem interações de fatores não significativos com fatores significativos e interações entre dois fatores não significativos.

2.2.2 Fluoreto de sódio

Após o estudo dos 7 dias com o conservante ácido ascórbico, fez-se o estudo com o conservante fluoreto de sódio. Na tabela 9 encontram-se os resultados obtidos para o fluoreto de sódio às várias condições de armazenamento.

Tabela 9: Resultados obtidos através do cálculo do rácio entre os sinais dos analitos e o sinal do padrão interno para o conservante fluoreto de sódio.

Ordem da exp.	Condições				Analitos					
	Temp. (°C)	Luz	Conc. (%)	Tempo (Dias)	CPZ	LVP	CYA	CLZ	HAL	QTP
1	4	P	1	1	0,071	1,369	0,081	0,136	0,176	0,557
2	4	P	1	7	0,061	1,292	0,071	0,097	0,354	0,800
3	4	P	2	7	0,059	1,269	0,074	0,097	0,396	0,873
4	4	A	1	1	0,094	1,858	0,099	0,183	0,262	0,746
5	25	P	2	7	0,016	0,408	0,020	0,010	0,155	0,120
6	25	A	1	7	0,048	1,070	0,057	0,107	0,180	0,499
7	25	A	2	7	0,057	1,387	0,063	0,058	0,093	0,154
8	25	A	1	1	0,077	1,558	0,082	0,249	0,521	0,774
9	4	A	2	7	0,052	1,276	0,057	0,059	0,082	0,125
10	25	A	2	1	0,069	1,435	0,068	0,099	0,122	0,275
11	25	P	1	7	0,026	0,962	0,049	0,037	0,223	0,196
12	4	A	1	7	0,063	1,259	0,058	0,073	0,071	0,116
13	25	P	2	1	0,037	0,924	0,045	0,060	0,081	0,144
14	4	P	2	1	0,064	1,475	0,073	0,091	0,150	0,302
15	25	P	1	1	0,080	1,716	0,095	0,129	0,174	0,349
16	4	A	2	1	0,053	1,250	0,055	0,085	0,064	0,253

Exp.-Experiência; Temp.-Temperatura; P-Presença; A-Ausência; Conc.-Concentração

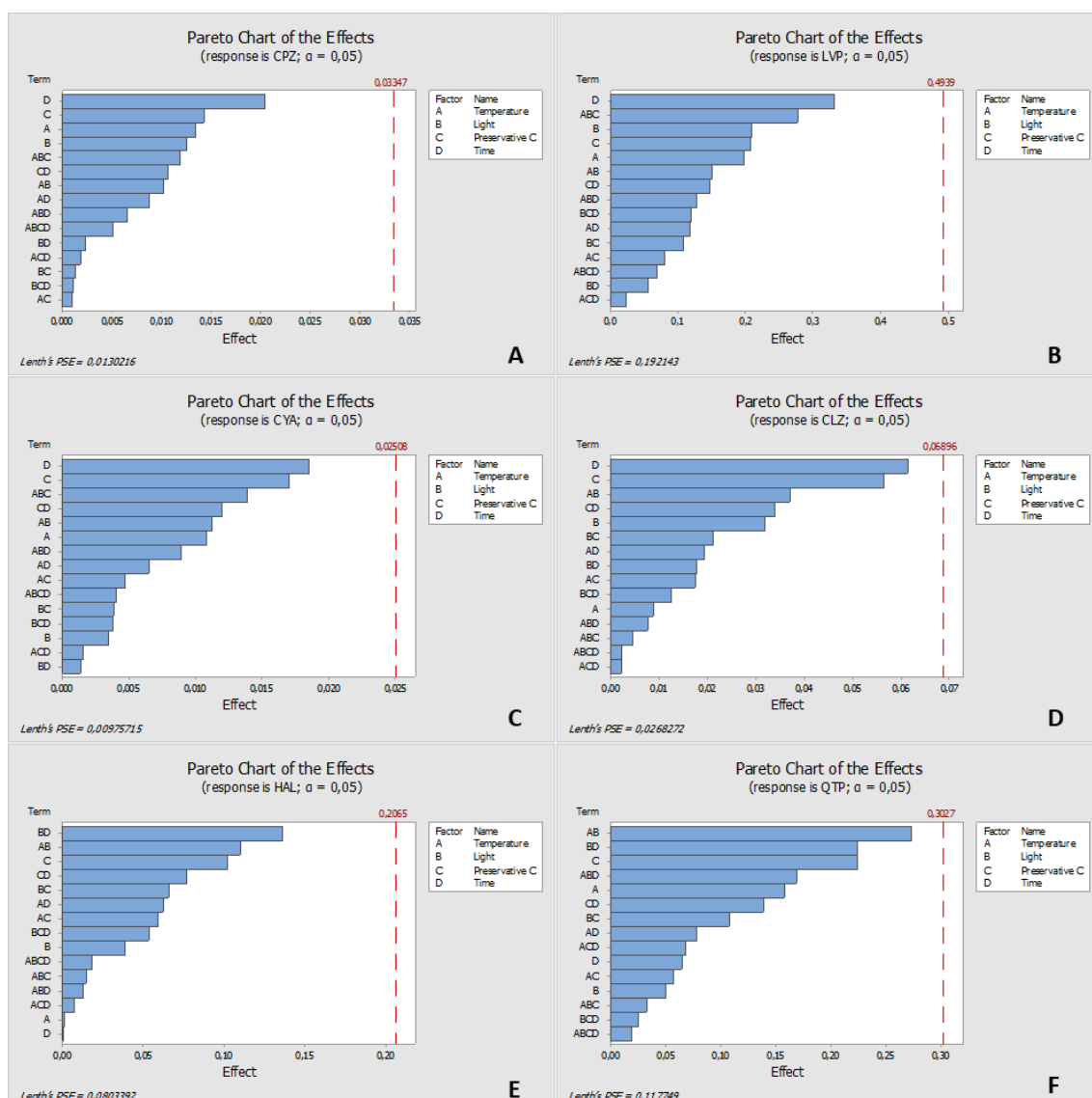


Figura 12: Paretos obtidos com demonstração da influência de cada fator e interação de fatores para cada composto individualmente com fluoreto de sódio. A-CPZ, B-LVP, C-CYA, D-CLZ, E-HAL, F-QTP

Pela análise dos gráficos de pareto é possível concluir que nenhum dos fatores em estudo tem significância estatística nos resultados obtidos com este conservante, pelo que a resposta dos analitos armazenados com o fluoreto de sódio não é influenciada por nenhum dos fatores. Apesar disto, existem alguns fatores que afetam mais a resposta do que outros, sendo eles o tempo de armazenamento para a CPZ, LVP, CYA e CLZ, a combinação do tempo de armazenamento e a influência da luz no caso do HAL e a combinação da temperatura de armazenamento com a influência da luz no caso da QTP.

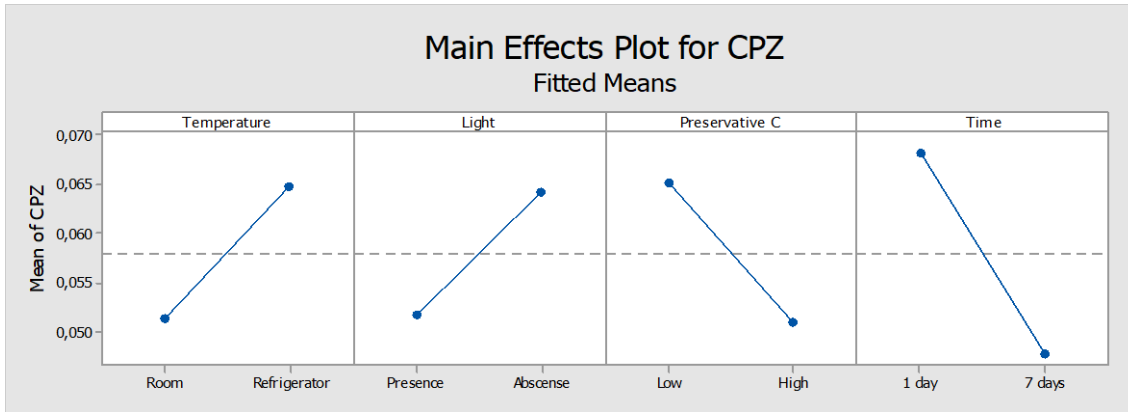


Gráfico 15: Efeitos principais para a CPZ com fluoreto de sódio.

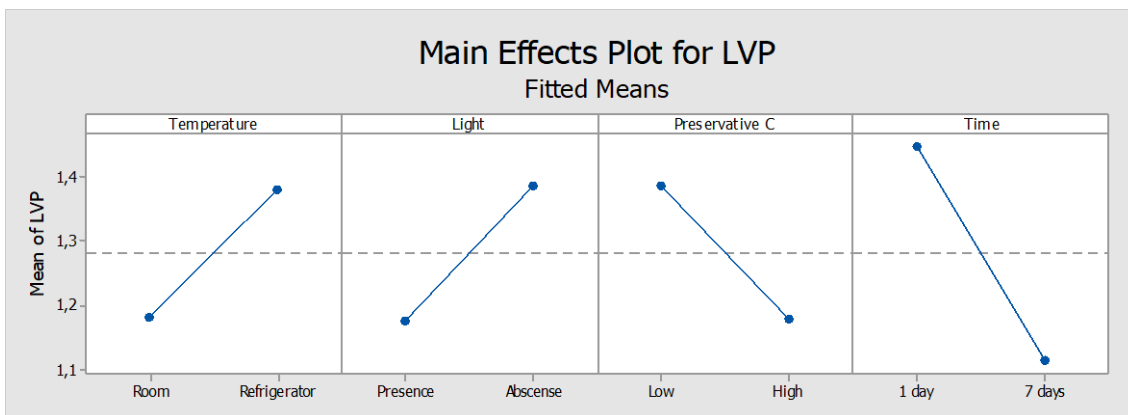


Gráfico 16: Efeitos principais para a LVP com fluoreto de sódio.

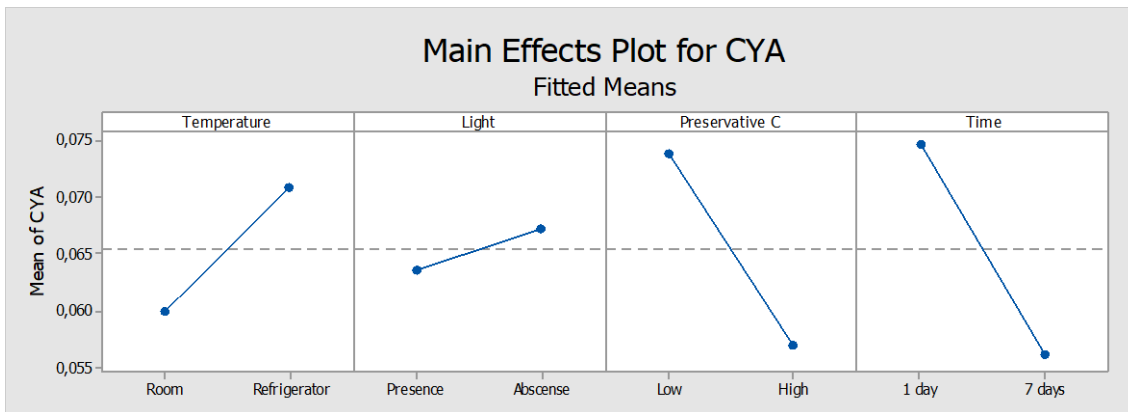


Gráfico 17: Efeitos principais para a CYA com fluoreto de sódio.

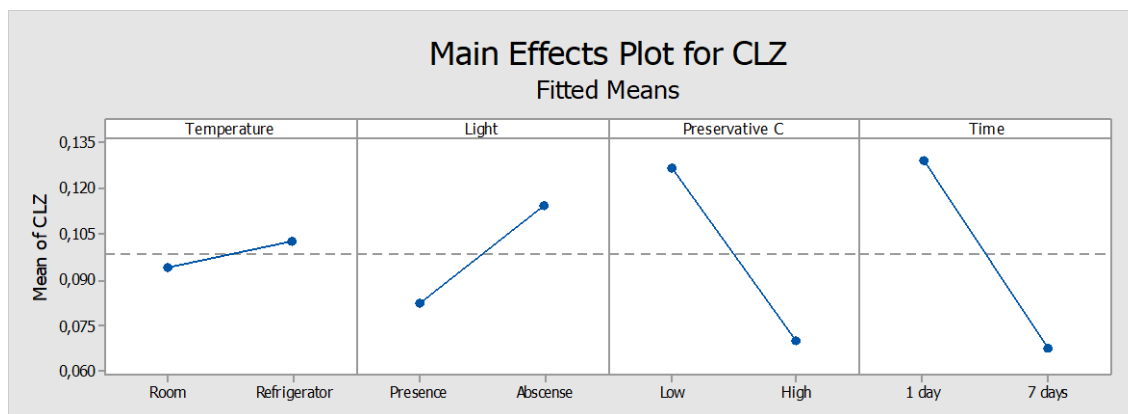


Gráfico 18: Efeitos principais para a CLZ com fluoreto de sódio.

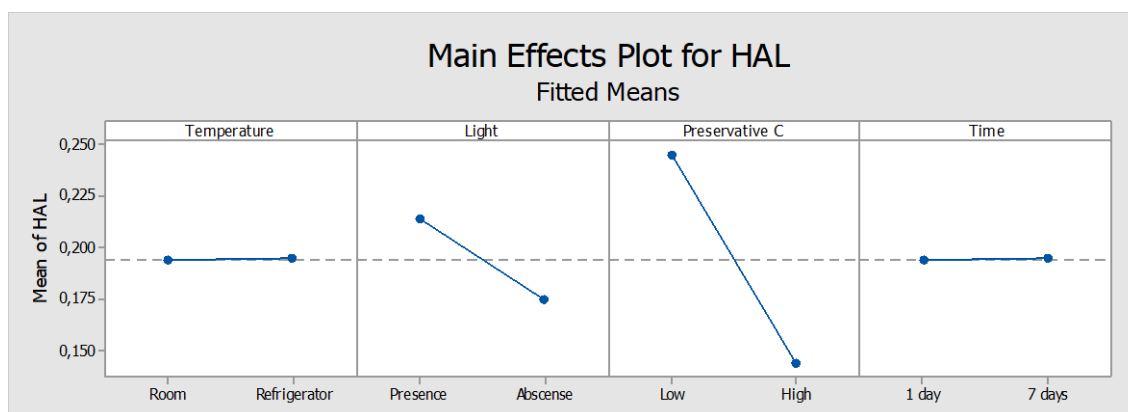


Gráfico 19: Efeitos principais para o HAL com fluoreto de sódio.

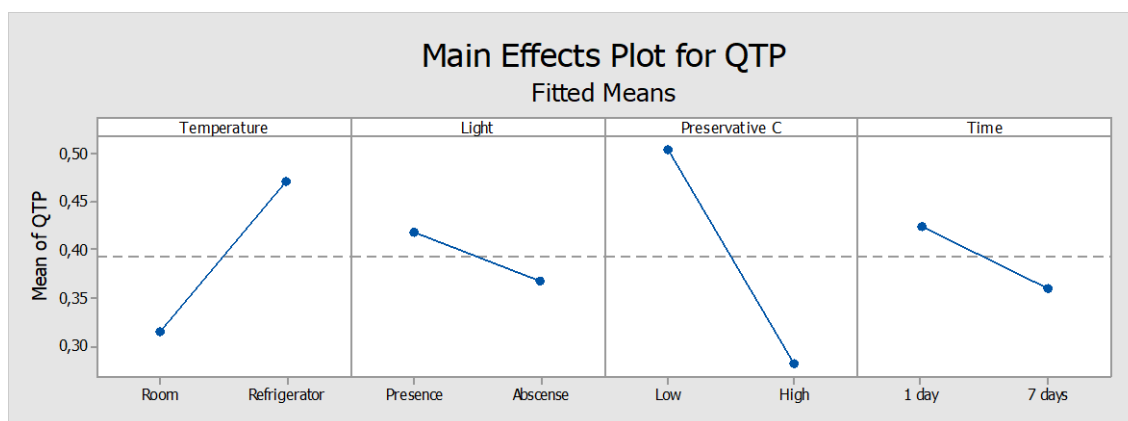


Gráfico 20: Efeitos principais para a QTP com fluoreto de sódio.

Apesar de não existir fatores com significância estatística com o fluoreto de sódio como conservante, cinco dos seis analitos (CPZ, LVP, CLZ, CYA, QTP) têm uma melhor resposta quando são armazenados a 4°C, sendo que para o HAL a temperatura de armazenamento não é relevante. Do mesmo modo, para quatro dos seis analitos (CPZ, LVP, CLZ e CYA) a resposta é melhor quando armazenados na ausência de luz, sendo que para a QTP e o HAL esta melhora quando o armazenamento é feito na presença de

luz. Para todos os analitos, o armazenamento com baixa concentração de fluoreto de sódio confere melhor resposta.

Relativamente ao tempo de armazenamento, para cinco dos seis analitos (CPZ, LVP, CLZ, CYA e QTP) a resposta é maior ao primeiro dia, sendo que no HAL o tempo de armazenamento na presença de fluoreto de sódio não influencia a resposta deste analito. Com base nestas interpretações, podemos deduzir que ao fim de 7 dias existem elevadas perdas de analitos, logo o fluoreto de sódio pode não ser um bom conservante.

No geral os analitos, tal como no ácido ascórbico, também têm melhores respostas a 4°C, na ausência de luz e a baixa concentração de conservante.

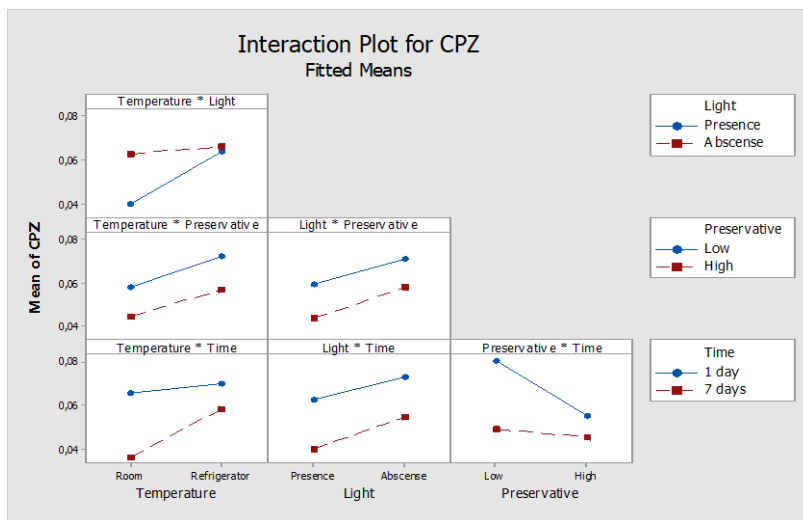


Gráfico 21: Interações de vários fatores para a CPZ com fluoreto de sódio.

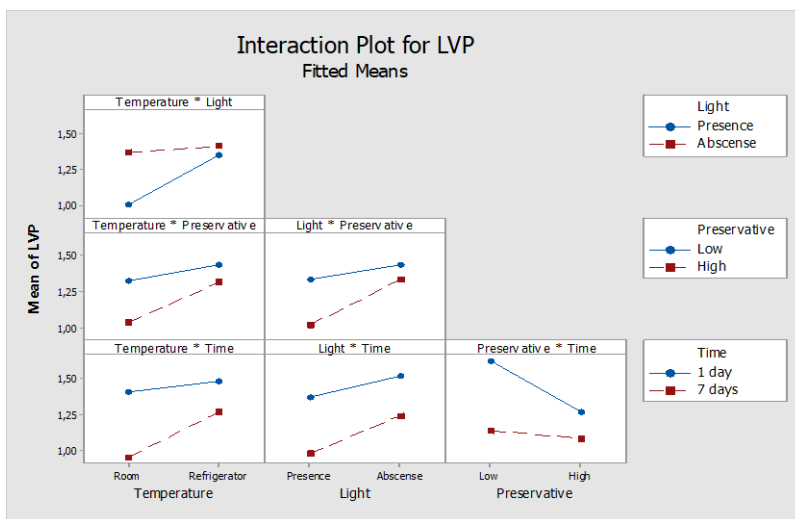


Gráfico 22: Interações de vários fatores para a LVP com fluoreto de sódio.

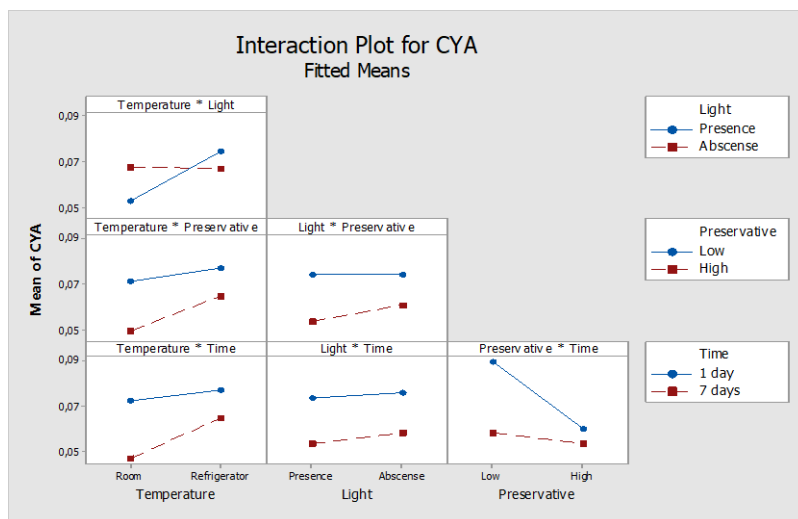


Gráfico 23: Interações de vários fatores para a CYA com fluoreto de sódio.

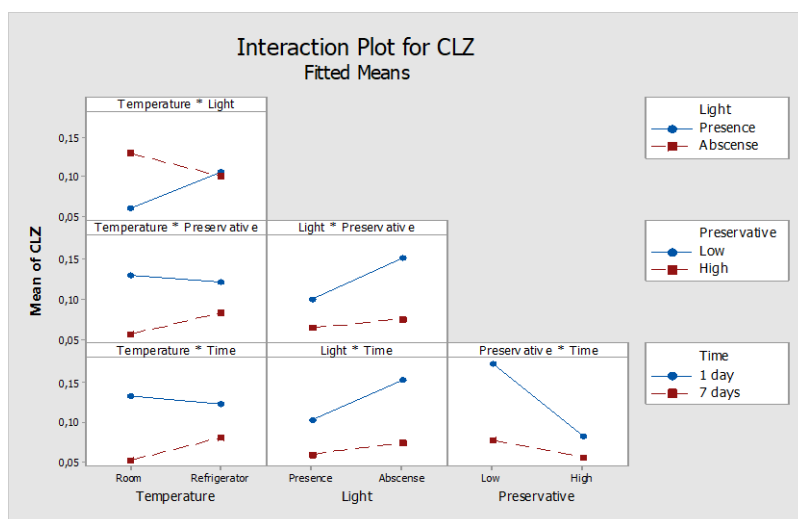


Gráfico 24: Interações de vários fatores para a CLZ com fluoreto de sódio.

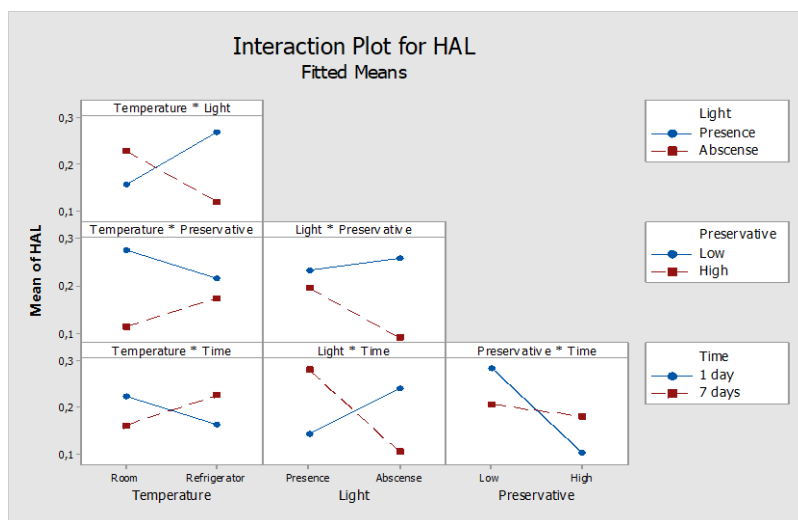


Gráfico 25: Interações de vários fatores para o HAL com fluoreto de sódio.

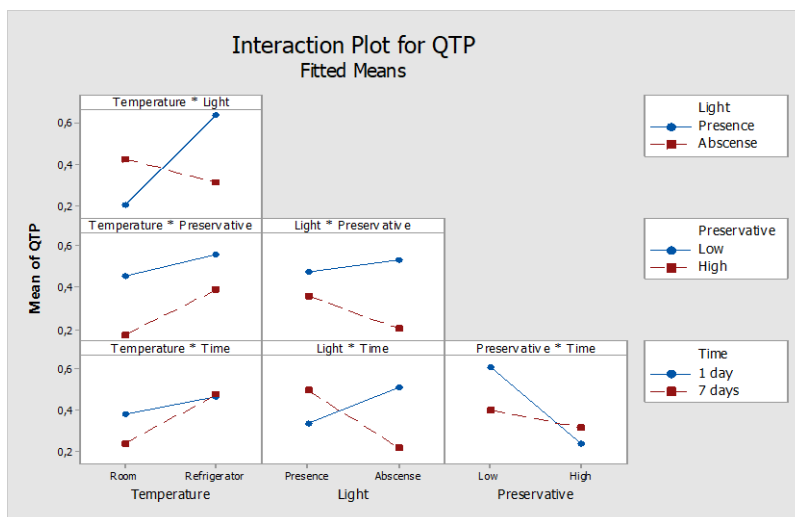


Gráfico 26: Interações de vários fatores para a QTP com fluoreto de sódio.

Apesar de existir, em praticamente todos os analitos, interações entre vários fatores, estas não são significativas, pelo que não afetam os resultados obtidos.

No caso dos analitos HAL e QTP, segundo os gráficos de pareto, a resposta era melhor quando existiam interações. Para o HAL (gráfico 25), a resposta obtida seria melhor após o armazenamento na presença de luz ao fim de 7 dias, e para a QTP (gráfico 26) a resposta obtida seria melhor após o armazenamento a 4°C na presença de luz. Contudo, uma vez mais estas interações não têm expressão estatisticamente significativa.

2.2.3 Azida de sódio

Após o estudo dos 7 dias com o fluoreto de sódio, prosseguiu-se para o estudo com o último conservante escolhido de modo a avaliar a estabilidade dos analitos quando as amostras foram armazenadas com azida de sódio. Na tabela 10 encontram-se os resultados obtidos para a azida de sódio às várias condições de armazenamento.

Tabela 10: Resultados obtidos através do cálculo do rácio entre os sinais dos analitos e o sinal do padrão interno para o conservante azida de sódio.

Ordem da exp.	Condições				Analitos					
	Temp. (°C)	Luz	Conc. (%)	Tempo (Dias)	CPZ	LVP	CYA	CLZ	HAL	QTP
1	4	P	0,1	1	0,088	1,743	0,077	0,077	0,103	0,157
2	4	P	0,1	7	0,026	0,481	0,025	0,073	0,518	0,881
3	4	P	0,2	7	0,024	0,647	0,03	0,049	0,396	0,676
4	4	A	0,1	1	0,106	2,211	0,108	0,162	0,289	0,449
5	25	P	0,2	7	0,014	0,443	0,015	0,02	0,146	0,198
6	25	A	0,1	7	0,039	0,98	0,044	0,048	0,342	0,35
7	25	A	0,2	7	0,025	0,974	0,038	0,036	0,189	0,175
8	25	A	0,1	1	0,072	1,632	0,063	0,081	0,098	0,172
9	4	A	0,2	7	0,062	1,341	0,082	0,133	0,593	0,999
10	25	A	0,2	1	0,102	2,289	0,094	0,09	0,133	0,341
11	25	P	0,1	7	0,019	0,303	0,015	0,011	0,081	0,072
12	4	A	0,1	7	0,044	1,098	0,057	0,076	0,42	0,371
13	25	P	0,2	1	0,095	2,064	0,096	0,146	0,244	0,453
14	4	P	0,2	1	0,089	1,999	0,093	0,202	0,312	0,809
15	25	P	0,1	1	0,043	1,075	0,051	0,058	0,05	0,101
16	4	A	0,2	1	0,103	2,254	0,109	0,198	0,361	0,885

Exp.-Experiência; Temp.-Temperatura; P-Presença; A-Ausência; Conc.-Concentração

Por observação dos cromatogramas ao fim dos 7 dias de estudo reparou-se que a maioria dos analitos apresentou um elevado grau de degradação quando armazenados com azida de sódio. Assim, este conservante foi excluído para a continuação do estudo da estabilidade, uma vez que não conferia estabilidade aceitável aos analitos. Na figura 13 e 14 encontram-se representados dois exemplos (CLZ e QTP) ao fim do primeiro dia de armazenamento e ao fim de 7 dias de armazenamento.

Dried Saliva Spots: Avaliação da estabilidade de antipsicóticos em amostras de fluido oral

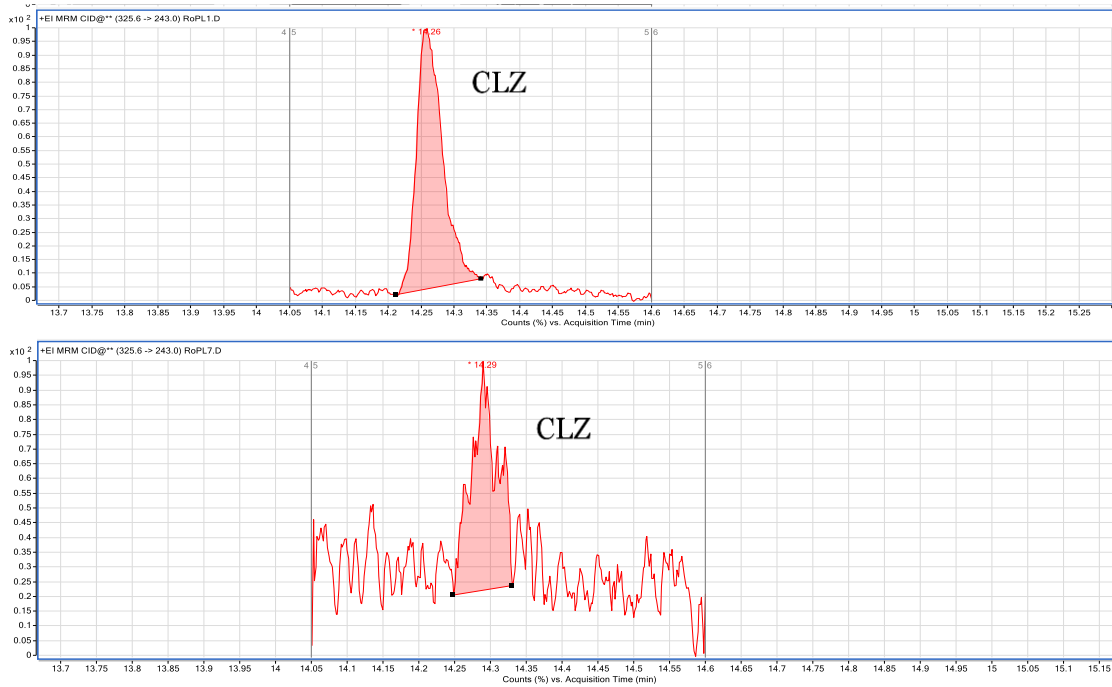


Figura 13: Cromatogramas no primeiro (superior) e sétimo (inferior) dia de extração para a CLZ (200 ng/mL) com azida de sódio (0,1%).

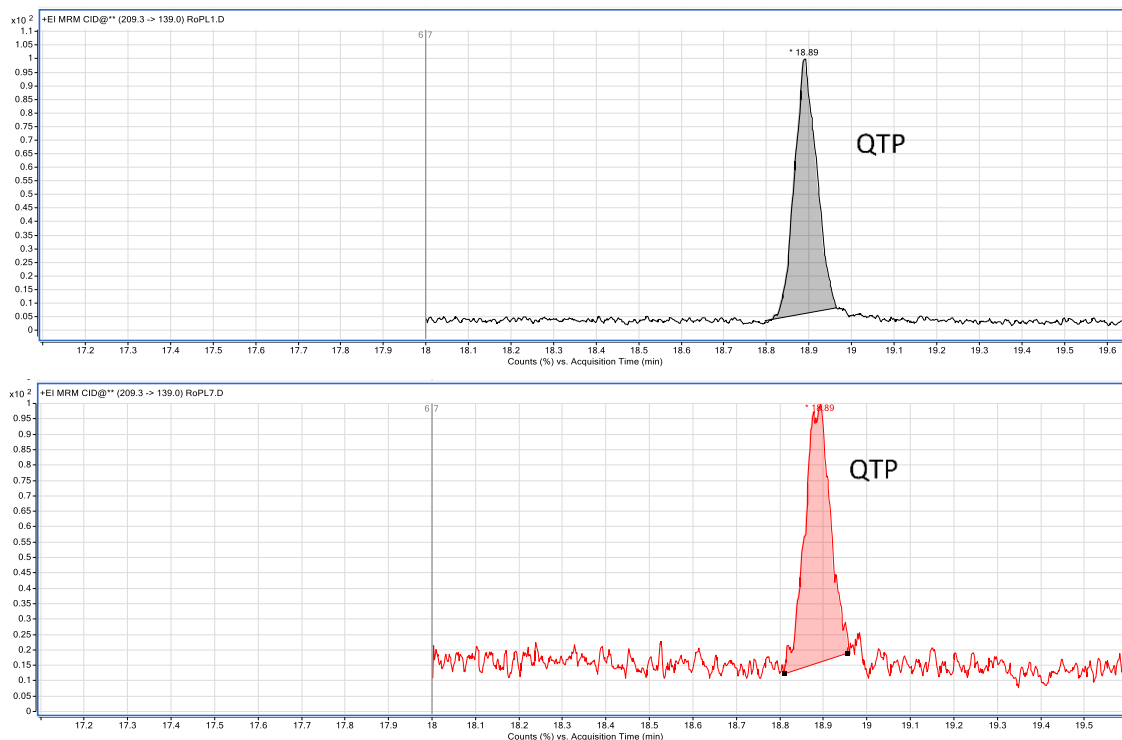


Figura 14: Cromatogramas no primeiro (superior) e sétimo (inferior) dia de extração para a QTP (200 ng/mL) com azida de sódio (0,1%).

2.2.4 DoE sem adição de conservantes

Após o estudo da estabilidade com a adição de conservantes, realizou-se um DoE sem adição de conservantes. Assim prepararam-se amostras apenas com fluido oral fortificado com os antipsicóticos, e procedeu-se à extração como indicado na seção 1.3.1 para ver o comportamento destes na ausência do conservante após o primeiro e sétimo dia de armazenamento a diferentes condições. O comportamento dos fármacos, tal como naqueles armazenados com conservantes, foi obtido através do cálculo da razão entre a área do composto e a área do padrão interno (tabela 11).

Tabela 11: Resultados obtidos para as amostras armazenadas a diferentes condições sem adição de conservante.

Dias	Exp.	Condições	CPZ	LVP	CYA	CLZ	HAL	QTP
1	1	A	0,080	1,465	0,049	0,057	0,126	0,141
	4	B	0,100	1,854	0,060	0,074	0,072	0,159
	8	C	0,092	1,501	0,061	0,035	0,126	0,141
	15	D	0,104	1,983	0,091	0,062	0,246	0,233
7	2	A	0,044	0,675	0,048	0,035	0,153	0,056
	12	B	0,111	1,952	0,086	0,055	0,100	0,124
	6	C	0,075	1,297	0,069	0,082	0,216	0,141
	11	D	0,013	0,347	0,018	0,008	0,073	0,033

Exp.-Experiência; A-Armazenamento a 4°C na presença de luz; B-armazenamento a 4°C na ausência de luz; C-armazenamento a 25°C na ausência de luz; D-armazenamento a 25°C na presença de luz

Posteriormente, calculou-se a resposta dos compostos entre o primeiro e sétimo dia, isto é, calcularam-se as médias dos valores obtidos entre estes dias. Os resultados encontram-se na tabela 12.

Tabela 12: Resultados obtidos através do cálculo das médias dos resultados obtidos entre o primeiro e o sétimo dia das amostras sem adição de conservante.

Condições	CPZ	LVP	CYA	CLZ	HAL	QTP
A	0,062	1,070	0,049	0,046	0,140	0,099
B	0,106*	1,903*	0,073*	0,064*	0,086	0,141
C	0,084	1,399	0,065	0,058	0,171*	0,185*
D	0,059	1,165	0,054	0,035	0,160	0,133

A-Armazenamento a 4°C na presença de luz; B-armazenamento a 4°C na ausência de luz; C-armazenamento a 25°C na ausência de luz; D-armazenamento a 25°C na presença de luz; *-melhores respostas para o efeito da luz.

Com estes valores, foi possível analisar o comportamento dos compostos quando armazenados a 4°C e a 25°C, bem como na presença e na ausência de luz. Os resultados

obtidos para o efeito da luz e da temperatura são na maioria concordantes com os resultados obtidos no DoE realizado com conservante.

Através da análise da tabela 12, é possível concluir que em termos de temperatura, para a CPZ e a LVP a resposta é mais elevada quando armazenados a 4°C, por outro lado para os compostos CYA, CLZ e QTP a resposta obtida no armazenamento a 4°C e a 25°C é semelhante, pelo que a temperatura para estes não é relevante. Relativamente ao HAL a melhor resposta obtida foi com o armazenamento a 25°C. No caso da influência da luz, para todos os analitos, as melhores respostas foram obtidas na ausência desta.

2.3 Condições finais para o estudo da estabilidade a longo prazo

Para apurar as condições em que o estudo da estabilidade a longo prazo irá ser realizado, compararam-se todos os gráficos obtidos (gráficos dos paretos e dos efeitos principais para o ácido ascórbico e para o fluoreto de sódio), assim como as tabelas do DoE realizado sem a adição de conservante.

Por comparação dos gráficos dos paretos do ácido ascórbico (figura 11) e do fluoreto de sódio (figura 12), observa-se que para o ácido ascórbico existe pelo menos 1 fator significativo que influencia a resposta obtida para todos os analitos, exceto para o HAL. Por outro lado, no conservante fluoreto de sódio não existe nenhum fator que tenha uma influência significativa nas respostas obtidas. No caso dos fatores que afetam os analitos armazenados com ácido ascórbico, é possível observar que os predominantes são a luz (CPZ, LVP e CYA) e a concentração de ácido ascórbico (CPZ, LVP, CLZ e QTP). Apesar de também se observar que estes fatores são os maioritários nas respostas obtidas com o fluoreto de sódio, estes não têm significância estatística. Por comparação dos sinais (rácios) apresentados nas tabelas de resultados destes dois compostos (tabelas 8 e 9) observa-se que, ao fim de 7 dias, existem menores perdas de analitos quando estes são armazenados com ácido ascórbico comparativamente aos que são armazenados com fluoreto de sódio. Assim, verifica-se que o ácido ascórbico é um melhor conservante, tendo sido este o escolhido para o estudo da estabilidade a longo prazo. Quanto à concentração deste conservante, os gráficos dos efeitos principais indicam a maioria de analitos com uma maior resposta (CPZ, LVP, CYA, CLZ e QTP) a reduzidas concentrações (300 ng/mL).

Relativamente ao efeito da luz, através da observação da tabela 12, as amostras com respostas maiores são a B e C. Assim, é possível concluir que o fator comum a estas condições de armazenamento é a ausência de luz, e como demonstrado nos gráficos dos

efeitos principais do ácido ascórbico, os analitos têm uma maior resposta na ausência de luz.

Apesar de não ser significativo, a maioria dos analitos armazenados com ácido ascórbico (CPZ, LVP, CLZ e CYA) são mais estáveis a 4°C. Este resultado é confirmado pela observação dos resultados do DoE sem conservante (tabela 12), com dois analitos com maior resposta a 4°C (CPZ e LVP), um analito cuja resposta é maior à temperatura ambiente (HAL) e três analitos em que as respostas obtidas não diferem muito entre si, pelo que o efeito da temperatura não é relevante (CYA, CLZ e QTP).

Através desta análise foi então possível decidir quais as condições a utilizar no estudo da estabilidade a longo prazo. Deste modo, o estudo foi realizado com baixas concentrações de ácido ascórbico, ausência de luz e armazenamento a 4°C.

Finalmente, mantendo as condições de luz e temperatura anteriormente citadas, quando comparamos os sinais para cada analito com 300 ng/mL de ácido ascórbico (tabela 8) e sem conservante (tabela 11), podemos observar maior sinal quando o conservante foi adicionado para os analitos, CLZ, HAL e QTP ao fim de 1 e 7 dias de armazenamento (tabela 13). Para os analitos CPZ, LVP e CYA, segundo a tabela 13, os sinais relativamente à presença ou ausência de conservante não variam durante os 7 dias de estudo.

Tabela 13: Resposta dos analitos com e sem conservante ao fim do armazenamento durante 1 e 7 dias a 4°C na ausência de luz.

	Dias	CPZ	LVP	CYA	CLZ	HAL	QTP
Sem conservante	1	0,100	1,854	0,060	0,074	0,072	0,159
	7	0,111	1,952	0,086	0,055	0,100	0,124
Com conservante	1	0,096	1,772	0,096	0,131	0,140	0,522
	7	0,094	1,108	0,103	0,154	0,363	0,699

2.4 Estudo da estabilidade a longo prazo

O estudo para a estabilidade a longo prazo foi realizado durante 146 dias. Durante este período foram realizadas 9 aplicações, isto é, foi realizado o estudo para verificar a estabilidade aos 146, 117, 44, 28, 21, 14, 7, 3 e 1 dias. Em cada dia, foram aplicados *spots* em triplicado, entre os quais os valores de variabilidade se encontram dentro dos 20%.

Para o dia 1 foi considerada uma percentagem de 100% para a quantidade de analito detetada. As quantidades de analito dos dias seguintes foram definidas tendo em conta a quantidade do primeiro dia. Para este estudo foi escolhida uma concentração de 200 ng/mL (exceto para o HAL que foi de 40 ng/mL), sendo esta um valor intermédio dentro das concentrações situadas no intervalo terapêutico.

Apenas foram considerados estáveis os analitos cujos valores de desvio do valor inicial são inferiores ou iguais a 20%. Os resultados encontram-se apresentados a seguir (tabela 14 e gráficos 27-32).

Tabela 14: Resultados da estabilidade ao longo de 146 dias para os fármacos CPZ, LVP, CYA, CLZ, HAL e QTP (n=3).

Analitos	Dias	Média	DP	CV (%)	Varição relativamente ao dia 1 (%)
CPZ	1	0,075	0,008	10	
	3	0,076	0,015	20	0
	7	0,073	0,005	7	-4
	14	0,071	0,010	14	-6
	21	0,045	0,007	15	-41
	28	0,050	0,008	16	-34
	44	0,032	0,006	18	-57
	117	0,033	0,002	7	-56
	146	0,033	0,006	18	-56
LVP	1	1,427	0,185	13	
	3	1,569	0,128	8	10
	7	1,490	0,139	9	4
	14	1,192	0,143	12	-16
	21	1,147	0,164	14	-20
	28	1,187	0,159	13	-17
	44	1,150	0,230	20	-19
	117	0,902	0,054	6	-37
	146	0,944	0,075	8	-34
CYA	1	0,059	0,007	11	
	3	0,061	0,006	10	4
	7	0,067	0,005	8	13
	14	0,053	0,004	8	-9
	21	0,049	0,003	5	-16
	28	0,055	0,010	19	-6
	44	0,049	0,008	16	-17
	117	0,050	0,004	7	-15
	146	0,048	0,005	11	-18
CLZ	1	0,108	0,004	4	
	3	0,110	0,011	10	2
	7	0,120	0,005	4	11
	14	0,095	0,014	15	-12
	21	0,090	0,015	17	-17
	28	0,089	0,015	17	-18
	44	0,052	0,009	17	-52
	117	0,036	0,006	18	-67
	146	0,043	0,004	10	-61
HAL	1	0,197	0,022	11	
	3	0,165	0,029	18	-16
	7	0,183	0,023	12	-7
	14	0,184	0,010	5	-6
	21	0,159	0,006	4	-19
	28	0,157	0,011	7	-20
	44	0,122	0,017	14	-38
	117	0,136	0,023	17	-31
	146	0,102	0,007	7	-48
QTP	1	0,312	0,023	8	
	3	0,295	0,056	19	-6
	7	0,289	0,045	16	-7
	14	0,257	0,037	14	-18
	21	0,168	0,029	17	-46
	28	0,183	0,028	15	-41
	44	0,124	0,023	18	-60
	117	0,132	0,026	19	-58
	146	0,126	0,023	19	-60

DP-Desvio padrão; CV-Coeficiente de variação

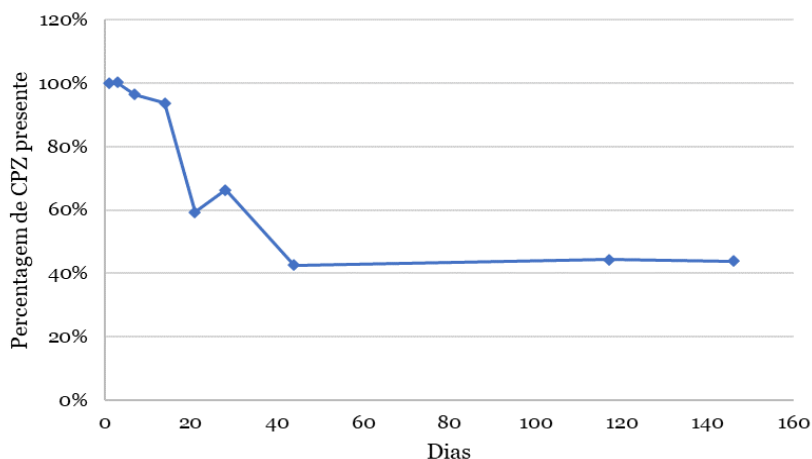


Gráfico 27: Estabilidade da CPZ em fluido oral armazenado em DSS ao longo de 146 dias.

Por observação da tabela 14 e do gráfico 27 conclui-se que o armazenamento da CPZ a 200 ng/mL, em fluido oral com 300 ng/mL de ácido ascórbico, em DSS a 4°C na ausência de luz lhe confere uma estabilidade de 14 dias, apresentando uma perda de 41% de analito ao vigésimo primeiro dia.

Não existem muitos estudos publicados na literatura onde os DSS sejam utilizados como técnica de amostragem ou de pré-tratamento das amostras para a determinação de antipsicóticos em fluido oral, o único estudo encontrado na literatura foi o de Caramelo *et al.*[54], pelo que se procedeu a comparar os resultados obtidos com os publicados neste artigo.

No estudo realizado por Caramelo *et al.*[54], o armazenamento do mesmo fármaco a concentrações de 150 e 350 ng/mL em DSS durante 4 dias a 25°C na presença de luz e sem conservante demonstrou desvios de 8,7% e 8,4%, respetivamente. No presente trabalho, o armazenamento deste fármaco durante 3 dias com ácido ascórbico, na ausência de luz e a 4°C não apresentou perdas. Após 7 dias de armazenamento a estas condições, a CPZ demonstrou um desvio de 4% relativamente ao primeiro dia, enquanto que no estudo de Caramelo *et al.*[54] ao 8º dia este fármaco já não apresentava estabilidade.

Comparativamente ao estudo de Caramelo *et al.* [54], a estabilidade da CPZ melhorou, uma vez que ao fim de 3 dias não apresentou alterações na concentração de analito, e ao fim de 7 dias ainda se mantinha estável, apresentando desvios da concentração inicial muito baixos. De facto, ao observarmos o gráfico 3, reparamos que as condições usadas favorecem a estabilidade da CPZ, no entanto é a ausência da luz (condição significativa) e a temperatura de armazenamento que conferem mais estabilidade à

CPZ, pois de acordo com a tabela 13, a presença de conservante não melhora a estabilidade deste analito.

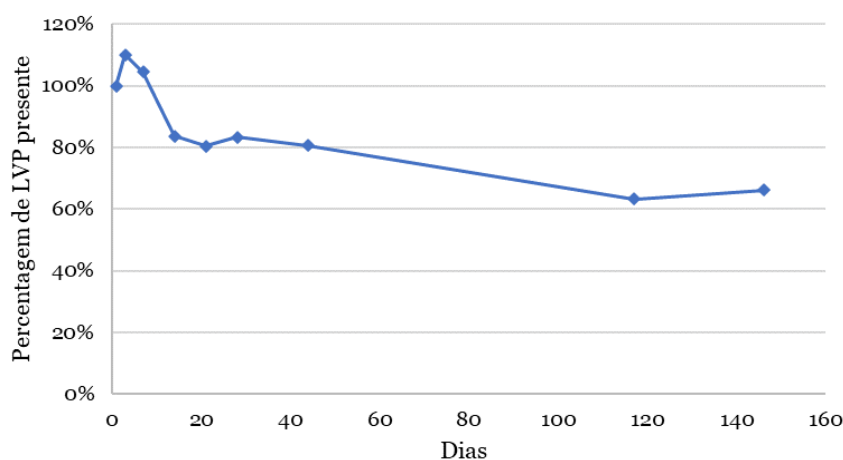


Gráfico 28: Estabilidade da LVP em fluido oral armazenado em DSS ao longo de 146 dias.

Relativamente ao fármaco LVP, apresentou uma estabilidade de 44 dias, após o armazenamento com 300 ng/mL de ácido ascórbico, em DSS na ausência de luz e a 4°C, observando-se uma perda superior a 30% após os 117 dias de armazenamento.

No estudo realizado por Caramelo *et al.*[54] este fármaco a concentrações de 150 e 350 ng/mL armazenado em DSS durante 4 dias a 25°C na presença de luz demonstrou desvios de 11,1% e 7,3% respectivamente, enquanto que no presente trabalho, após 3 dias de armazenamento observaram-se desvios na concentração na ordem dos 10% relativamente ao primeiro dia. Após 7 dias de armazenamento este analito ainda se apresentava estável (4%), enquanto que após 8 dias, no estudo de Caramelo *et al.*[54], este analito já não apresentava estabilidade.

Quando comparado com o estudo de Caramelo *et al.*[54], este fármaco apresenta maior estabilidade ao fim de 7 dias com o uso de ácido ascórbico, a 4°C e na ausência de luz. Segundo o gráfico 4, este analito tem melhor resposta a 4°C e na ausência de luz (condição significativa), pelo que, ao ser armazenado nas condições definidas para o estudo, os resultados obtidos seriam expectáveis. De modo similar ao que se verificou na situação anterior, a adição de conservante a este fármaco não afeta a resposta obtida (tabela 13).

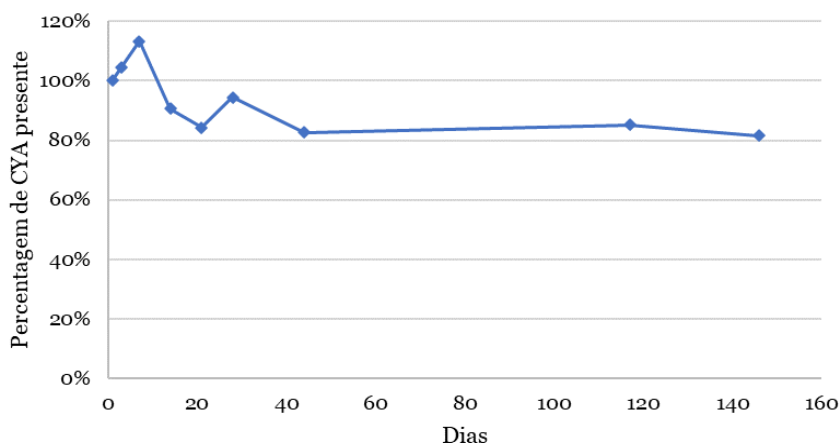


Gráfico 29: Estabilidade da CYA em fluido oral armazenado em DSS ao longo de 146 dias.

Através da tabela 14 e do gráfico 29, verificamos que a CYA apresentou-se estável durante os 146 dias de estudo, com 300 ng/mL de ácido ascórbico, em DSS a 4°C na ausência de luz.

Segundo Caramelo *et al.*[54] este fármaco a concentrações de 150 e 350 ng/mL armazenado em DSS durante 4 dias a 25°C na presença de luz demonstrou desvios de 10,9% e 4,8%, respetivamente, relativamente à concentração inicial, sendo que no 8º dia já não apresentava estabilidade.

Comparativamente ao estudo mencionado, o armazenamento de CYA às condições definidas melhora significativamente a estabilidade deste analito (o que se encontra em linha com as conclusões retiradas do gráfico 5), visto que possui uma alteração na sua concentração inicial em apenas 2% ao fim de 3 dias e que apresenta uma variabilidade <20% na sua concentração ao fim de 146 dias, o que permite uma quantificação fiável após este tempo de armazenamento.

Tal como nos dois analitos anteriores, a presença de ácido ascórbico no armazenamento da CYA não é significativa para a resposta deste analito ao fim de 7 dias, pelo que os parâmetros que conferem estabilidade à CYA são o armazenamento na ausência de luz (condição significativa, segundo o gráfico 5) e a 4°C.

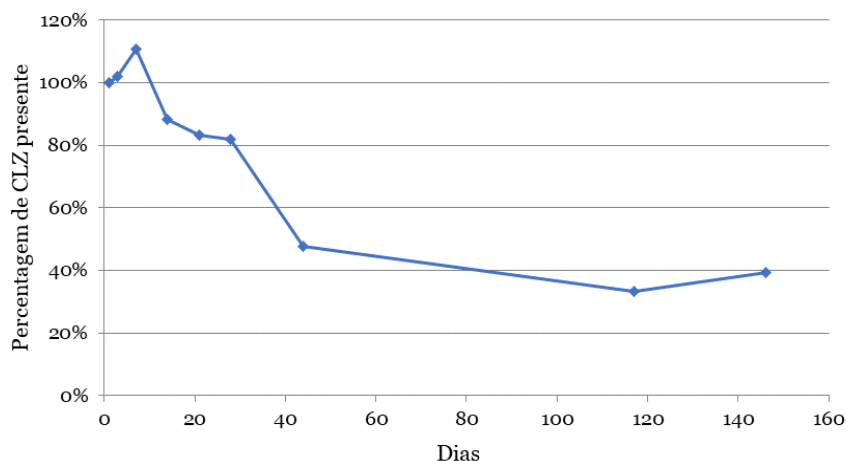


Gráfico 30: Estabilidade da CLZ em fluido oral armazenadas em DSS ao longo de 146 dias.

A CLZ, a 200 ng/mL, apresenta uma estabilidade de 28 dias, com perdas superiores a 50% após os 44 dias de armazenamento com 300 ng/mL de ácido ascórbico, em DSS na ausência de luz e a 4°C.

Na ausência de conservante, o armazenamento deste fármaco a concentrações de 150-350 ng/mL em DSS na presença de luz e a 25°C ao fim de 4 dias apresenta desvios da sua concentração inicial de 0,6% a 1,2% , sendo que a partir do 8º dia não apresenta estabilidade (perdas superiores a 50%)[54].

Comparativamente ao estudo de Caramelo *et al.*[54], este fármaco armazenado com ácido ascórbico a 4°C na ausência de luz apenas apresenta diferenças significativas na sua estabilidade ao fim dos 7-8 dias de armazenamento.

No estudo de Fisher *et al.*[52] a estabilidade da CLZ foi estudada em fluido oral (recolhido pelo método de drooling e sem ser aplicado em DSS), e verificou-se que este fármaco permaneceu estável por 1 semana, a concentrações de 150, 400 e 1200 ng/mL se armazenado a temperaturas de 2 a 8°C. Comparativamente ao presente estudo, verifica-se que o armazenamento em DSS confere uma estabilidade à CLZ por mais tempo. No estudo de Patteet *et al.*[95], a CLZ a 240 e 2000 ng/mL, presente em fluido oral recolhido com o dispositivo Quantisal™ e armazenado num tubo de polipropileno a 4°C, permaneceu estável durante 7 dias.

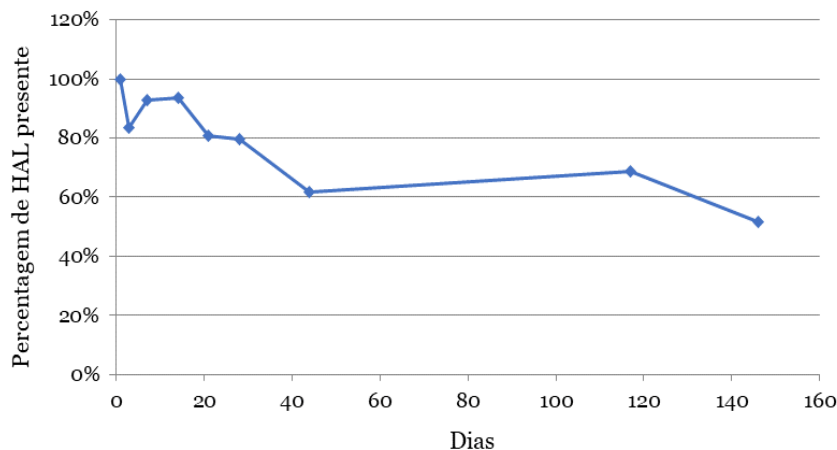


Gráfico 31: Estabilidade do HAL em fluido oral armazenado em DSS ao longo de 146 dias.

O HAL, a 40 ng/mL, demonstrou uma estabilidade de 28 dias após o seu armazenamento com 300 ng/mL de ácido ascórbico em DSS na ausência de luz e a 4°C, apresentando perdas superiores a 30% após 44 dias de armazenamento.

A concentrações de 30-70 ng/mL este fármaco, ao fim de 4 dias de armazenamento sem conservante, a 25°C e na presença de luz demonstra desvios mínimos da sua concentração inicial de 2,2% e 13%, os quais não se alteraram muito passados os 8 dias de armazenamento (6,2-7,9%)[54]. De acordo com o presente trabalho, os desvios da concentração inicial obtidos para os mesmos dias estão entre 7 e 16 %. Apesar de o HAL ser considerado estável à mesma, verifica-se que os desvios, no presente trabalho, foram ligeiramente maiores que os desvios obtido no trabalho de Caramelo *et al.*[54]. Tal se pode dever ao facto de o armazenamento deste fármaco não ter sido feito a 25°C (temperatura de armazenamento que confere melhor resposta ao HAL segundo o gráfico 7), como no trabalho de Caramelo *et al.*[54]. Apesar de a concentração de conservante usada também não ter sido a confere melhor resposta a este fármaco (segundo o gráfico 7, a presença de 600 ng/mL de ácido ascórbico conferia melhor resposta), segundo a tabela 13 é possível verificar que a presença de 300 ng/mL de ácido ascórbico melhora o sinal do HAL comparativamente à ausência do conservante. Contudo, este fármaco apresentou uma boa estabilidade no fluido oral armazenado nas condições definidas. Segundo Patteet *et al.*[95], este fármaco, presente em fluido oral recolhido com o dispositivo Quantisal™ e armazenado num tubo de polipropileno a 4°C, a concentrações de 2,4 e 56 ng/mL permaneceu estável por 7 dias.

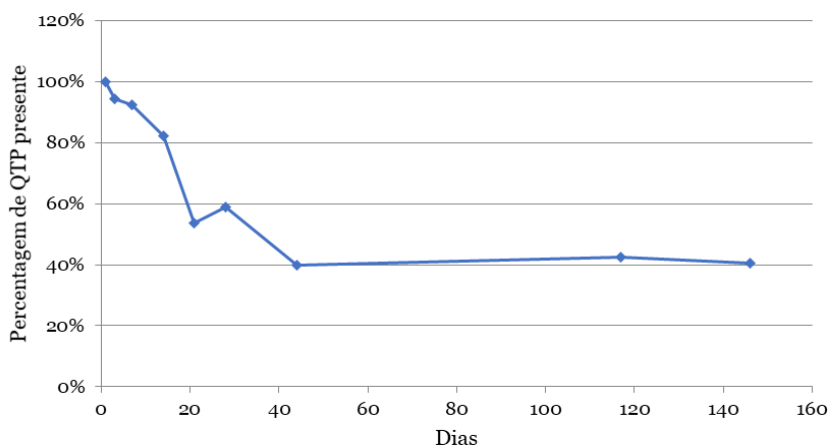


Gráfico 32: Estabilidade da QTP em fluido oral armazenado em DSS ao longo de 146 dias.

Através da tabela 14 e do gráfico 32, concluímos que a QTP é estável por 14 dias, apresentando perdas superiores a 40% após este tempo de armazenamento em fluido oral com 300 ng/mL de ácido ascórbico e em DSS, na ausência de luz e a 4°C.

No estudo de Caramelo *et al.*[54] este fármaco a concentrações de 150 e 350 ng/mL armazenado durante 4 dias apresentou desvios da sua concentração inicial entre 6,1% e 3,2%, respectivamente, enquanto que no armazenamento durante 8 dias, observaram-se desvios de 5,4% e 12,7%. No presente trabalho ao fim de 3 e 7 dias observaram-se desvios de concentração de 6% e 7%, respectivamente.

Comparativamente ao estudo de Caramelo *et al.*[54], a estabilidade deste fármaco ao fim de 3/4 dias é semelhante, enquanto que a partir de uma semana existem grandes melhorias no armazenamento com ácido ascórbico na ausência de luz. A temperatura de armazenamento, como visto no gráfico dos efeitos principais deste composto em DSS (gráfico 8) não é relevante, no entanto a luz tem alguma influência no armazenamento, apesar de não ser significativa, e a presença de ácido ascórbico também melhora a resposta da QTP (tabela 13).

No estudo de Fisher *et al.*[52] a QTP permaneceu estável durante 1 semana armazenado a temperaturas de 2-8°C na matriz de fluido oral (sem ser aplicada em DSS) a concentrações de 25, 250 e 400 ng/mL. O armazenamento deste fármaco em DSS, confere-lhe estabilidade por mais uma semana, sensivelmente. No estudo de Patteet *et al.*[95] este fármaco em fluido oral recolhido com o dispositivo Quantisal™, permaneceu estável por 7 dias a concentrações de 48 e 2000 ng/mL armazenado a 4°C.

3. Conclusões e considerações finais

No presente trabalho, a estabilidade de seis fármacos antipsicóticos em fluido oral na presença de diversos conservantes e em diferentes condições de armazenamento foi estudada. Para tal, recorreu-se à realização de um desenho experimental através do *software* MINITAB®.

Foi estudada a adição de ácido ascórbico, fluoreto de sódio e ainda azida de sódio a fim de aumentar a estabilidade destas substâncias nas amostras de fluido oral utilizando os DSS como ferramenta de armazenamento e pré-tratamento da amostra.

Após análise dos resultados, foi possível chegar à conclusão de que as melhores condições de armazenamento para os analitos de modo a que apresentassem uma melhor estabilidade seria com ácido ascórbico a uma concentração de 300ng/mL, com armazenamento a 4°C e na ausência de luz. Contudo, a presença de conservante só é significativa para a resposta dos analitos CLZ, HAL e QTP.

Com estas condições, concluímos que a CPZ e a QTP se mantêm estáveis durante 14 dias, a LVP permanece estável por 44 dias, a CYA manteve-se estável durante todo o período de estudo (146 dias) e a CLZ e o HAL demonstraram uma boa estabilidade até aos 28 dias de armazenamento. Comparativamente com um estudo anterior onde os compostos perderam estabilidade a partir de 1 semana aproximadamente, é possível afirmar que as condições anteriormente indicadas aumentam significativamente a estabilidade dos analitos em estudo.

Assim, no geral, as condições definidas para o estudo conferem estabilidade aos fármacos por 2 semanas ou mais, no entanto para o fármaco HAL poderiam ser realizados mais estudos, de modo a tentar prolongar a sua estabilidade em fluido oral e em DSS para além dos 28 dias, visto que a temperatura e a concentração de ácido ascórbico a que este fármaco foi armazenado não são as que lhe conferem maior resposta.

É de salientar que este é o primeiro estudo realizado que permite avaliar a estabilidade dos fármacos CPZ, LVP, CYA, CLZ, HAL e QTP a longo prazo, nesta matriz biológica.

Bibliografia:

1. Hadland SE, Levy S (2016) Objective Testing: Urine and Other Drug Tests. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 25:549–565 .
<https://doi.org/10.1016/j.chc.2016.02.005>
2. Gonçalves J, Rosado T, Soares S, Simão A, Caramelo D, Luís Â, Fernández N, Barroso M, Gallardo E, Duarte A (2019) Cannabis and Its Secondary Metabolites: Their Use as Therapeutic Drugs, Toxicological Aspects, and Analytical Determination. *Medicines* 6:31 .
<https://doi.org/10.3390/medicines6010031>
3. Gallardo E, Queiroz JA (2008) The role of alternative specimens in toxicological analysis. *Biomed Chromatogr* 22:795–821 . <https://doi.org/10.1002/bmc.1009>
4. Elmongy H, Abdel-Rehim M (2016) Saliva as an alternative specimen to plasma for drug bioanalysis. A review. *TrAC - Trends Anal Chem* 83:70–79 .
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.07.010>
5. Horning M, Brown L, Nowlin J, Lertratanangkoon K, Kellaway P, Zion T (1977) The use of saliva in therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 23:157–164 .
<https://doi.org/10.1093/clinchem/23.2.157>
6. Barroso M, Gallardo E, Vieira DN, Queiroz JA, López-Rivadulla M (2011) Bioanalytical procedures and recent developments in the determination of opiates/opioids in human biological samples. *Anal Bioanal Chem* 400:1665–1690 . <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4888-4>
7. Choo RE, Huestis MA (2004) Oral fluid as a diagnostic tool. *Clin Chem Lab Med* 42:1273–1287 . <https://doi.org/10.1515/CCLM.2004.248>
8. Yoshizawa JM, Schafer CA, Schafer JJ, Farrell JJ, Paster BJ, Wong DTW (2013) Salivary biomarkers: Toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin Microbiol Rev* 26:781–791 . <https://doi.org/10.1128/CMR.00021-13>
9. Gallardo E, Barroso M, Queiroz JA (2009) Current technologies and considerations for drug bioanalysis in oral fluid. *Bioanalysis* 1:637–667 .
<https://doi.org/10.4155/bio.09.23>
10. Crouch DJ, Day J, Baudys J (2004) Evaluation of saliva/oral fluid as a alternate drug testing specimen. In: *Natl. Inst. Stand. Technol.* <https://www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/grants/203569.pdf>. Accessed 9 Feb 2020
11. Niu Z, Zhang W, Yu C, Zhang J, Wen Y (2018) Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques. *TrAC Trends Anal Chem* 102:123–146 .
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.02.005>
12. Tran ON, Wang H, Dean DD, Chen X-D, Yeh C-K (2019) Stem Cell-Based

- Restoration of Salivary Gland Function. In: Chen X-D (ed) *A Roadmap to Non-Hematopoietic Stem Cell-based Therapeutics*, 1st ed. Elsevier, pp 345–366
13. Porcheri C, Mitsiadis TA (2019) Physiology, Pathology and Regeneration of Salivary Glands. *Cells* 8:1–19 . <https://doi.org/10.3390/cells8090976>
 14. Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C (2011) Diagnostic potential of saliva: Current state and future applications. *Clin Chem* 57:675–687 . <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.153767>
 15. Proctor GB, Shaalan AK (2018) Salivary Gland Secretion. In: Said H (ed) *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 6th ed. Elsevier Inc., pp 813–830
 16. Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, Palo EF De (2007) Saliva specimen : A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta* 383:30–40 . <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.04.011>
 17. Singh M, Meenu S, Sayanti S, Mayank B, Pragzna Y, Bommi D (2014) Non-Invasive Diagnostic Tool for Pathological Conditions: Salivary Biomarkers. *Int J Pharm Biol Arch* 5:1–12
 18. Bellagambi FG, Lomonaco T, Salvo P, Vivaldi F, Hangouët M, Ghimenti S, Biagini D, Di Francesco F, Fuoco R, Errachid A (2020) Saliva sampling: Methods and devices. An overview. *TrAC Trends Anal Chem* 124:1–15 . <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115781>
 19. Martí-Álamo S, Mancheño-Franch A, Marzal-Gamarra C, Carlos-Fabuel L (2012) Saliva as a diagnostic fluid. Literature review. *J Clin Exp Dent* 4:e237–e243 . <https://doi.org/10.4317/jced.50865>
 20. Bhattarai KR, Kim H-R, Chae H-J (2018) Compliance with Saliva Collection Protocol in Healthy Volunteers: Strategies for Managing Risk and Errors. *Int J Med Sci* 15:823–831 . <https://doi.org/10.7150/ijms.25146>
 21. Zhang A, Sun H, Wang X (2012) Saliva metabolomics opens door to biomarker discovery, disease diagnosis, and treatment. *Appl Biochem Biotechnol* 168:1718–1727 . <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9891-5>
 22. Zhang CZ, Cheng XQ, Li JY, Zhang P, Yi P, Xu X, Zhou XD (2016) Saliva in the diagnosis of diseases. *Int J Oral Sci* 8:133–137 . <https://doi.org/10.1038/ijos.2016.38>
 23. Fisher DS, Van Schalkwyk GI, Seedat S, Curran SR, Flanagan RJ (2013) Plasma, oral fluid, and whole-blood distribution of antipsychotics and metabolites in clinical samples. *Ther Drug Monit* 35:345–351 . <https://doi.org/10.1097/FTD.obo13e318283eaf2>
 24. Aps JKM, Martens LC (2005) Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int* 150:119–131 .

- <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.10.026>
25. Kintz P, Spihler V, Negrusz A (2008) Alternative specimens. In: Jickells S, Negrusz A (eds) *Clarke's Analytical Forensic Toxicology*, 1st ed. London, pp 153–190
 26. Drummer OH (2006) Drug testing in oral fluid. In: *Clin. Biochem.* https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1579288/pdf/cbr27_3p147.pdf. Accessed 20 Jan 2020
 27. Stoykova S, Atanasov V, Pantcheva I (2015) Determination of some biochemical parameters in oral fluid and evaluation of their stability under different storage conditions. *Toxicol Anal Clin* 27:195–202 . <https://doi.org/10.1016/j.toxac.2015.03.111>
 28. Gardner A, Carpenter G, So PW (2020) Salivary metabolomics: From diagnostic biomarker discovery to investigating biological function. *Metabolites* 10:1–23 . <https://doi.org/10.3390/metabo10020047>
 29. Meleti M, Cassi D, Vescovi P, Setti G, Pertinhez T, Eleonora M (2020) Salivary biomarkers for diagnosis of systemic diseases and malignant tumors. A systematic review. *Oral Med Pathol* 25:e299-310 . <https://doi.org/10.4317/medoral>
 30. Wong DT (2008) Salivary Diagnostics: Amazing as it might seem, doctors can detect and monitor diseases using molecules found in a sample of spit. *Am Sci* 96:37–43 . <https://doi.org/10.1511/2008.69.3669>
 31. Tsai CT, Robinson P V, De Jesus Cortez F, Elma MLB, Seftel D, Pourmandi N, Pandori MW, Bertozzi CR (2018) Antibody detection by agglutination-PCR (ADAP) enables early diagnosis of HIV infection by oral fluid analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:1250–1255 . <https://doi.org/10.1073/pnas.1711004115>
 32. Portilho MM, Nabuco LC, Villela-Nogueira CA, Brandão-Mello CE, Pilotto JH, Flores GL, Lewis-Ximenez LL, Lampe E, Villar LM (2018) Detection of occult hepatitis B in serum and oral fluid samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 113:62–65 . <https://doi.org/10.1590/0074-02760170071>
 33. Villar LM, Bezerra CS, Cruz HM, Portilho MM, Flores GL (2019) Applicability of oral fluid and dried blood spot for hepatitis B virus diagnosis. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2019:1–11 . <https://doi.org/10.1155/2019/5672795>
 34. Bristow CC, Shannon C, Herbst De Cortina S, Klausner JD (2018) Use of oral fluid with a rapid treponemal test for syphilis evaluation. *Sex Transm Dis* 45:e65–e67 . <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000840>
 35. Bodewes R, Kerkhof J, Cremer J, Gijsselaar DB, Voordouw BCG, Veldhuijzen IK, Schipper M, van Binnendijk R (2019) Oral fluid: Non-invasive alternative for

- parvovirus B19 diagnosis? *J Clin Virol* 117:5–10 .
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.05.008>
36. Mauramo M, Ramseier AM, Mauramo E, Buser A, Tervahartiala T, Sorsa T, Waltimo T (2018) Associations of oral fluid MMP-8 with periodontitis in Swiss adult subjects. *Oral Dis* 24:449–455 . <https://doi.org/10.1111/odi.12769>
37. Ahmadi-Motamayel F, Goodarzi MT, Tarazi S, Vahabian M (2019) Evaluation of salivary acetylcholinesterase and pseudocholinesterase in patients with Alzheimer’s disease: A case–control study. *Spec Care Dent* 39:39–44 .
<https://doi.org/10.1111/scd.12342>
38. Song W, Kothari V, Velly AM, Cressatti M, Liberman A, Gornitsky M, Schipper HM (2018) Evaluation of salivary heme oxygenase-1 as a potential biomarker of early Parkinson’s disease. *Mov Disord* 33:583–591 .
<https://doi.org/10.1002/mds.27328>
39. Hu S, Gao K, Pollard R, Arellano-Garcia M, Zhou H, Zhang L, Elashoff D, Kallenberg CGM, Vissink A, Wong DT (2010) Preclinical validation of salivary biomarkers for primary Sjögren’s syndrome. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 62:1633–1638 . <https://doi.org/10.1002/acr.20289>
40. Medina ML, Medina MG, Martín GT, Picón SO, Bancalari A, Merino LA (2010) Molecular detection of *Helicobacter pylori* in oral samples from patients suffering digestive pathologies. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 15:e38–42 .
<https://doi.org/10.4317/medoral.15.e38>
41. Morales-Espinosa R, Fernandez-Presas A, Gonzalez-Valencia G, Flores-Hernandez S, Delgado-Sapien G, Mendez-Sanchez JL, Sanchez-Quezada E, Muñoz-Pérez L, Leon-Aguilar R, Hernandez-Guerrero J, Cravioto A (2009) *Helicobacter pylori* in the oral cavity is associated with gastroesophageal disease. *Oral Microbiol Immunol* 24:464–468 . <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2009.00541.x>
42. Raff H (2009) Utility of Salivary Cortisol Measurements in Cushing’s Syndrome and Adrenal Insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 94:3647–3655 .
<https://doi.org/10.1210/jc.2009-1166>
43. Streckfus C, Bigler L, Dellinger T, Dai X, Kingman A, Thigpen JT (2000) The presence of soluble c-erbB-2 in saliva and serum among women with breast carcinoma: A preliminary study. In: *Clin. Cancer Res.* <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/clincanres/6/6/2363.full.pdf>.
Accessed 6 Mar 2020
44. Zhang L, Xiao H, Zhou H, Santiago S, Lee JM, Garon EB, Yang J, Brinkmann O, Yan X, Akin D, Chia D, Elashoff D, Park NH, Wong DTW (2012) Development of

- transcriptomic biomarker signature in human saliva to detect lung cancer. *Cell Mol Life Sci* 69:3341–3350 . <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1027-0>
45. Dillon MC, Opris DC, Kopanczyk R, Lickliter J, Cornwell HN, Bridges EG, Nazar AM, Bridges KG (2010) Detection of homocysteine and C-reactive protein in the saliva of healthy adults: Comparison with blood levels. *Biomark Insights* 2010:57–61 . <https://doi.org/10.4137/bmi.s5305>
 46. Mata DC (2016) Stability of 26 sedative hypnotics in six toxicological matrices at different storage conditions. *J Anal Toxicol* 40:663–668 . <https://doi.org/10.1093/jat/bkw084>
 47. Peters FT (2007) Stability of analytes in biosamples-an important issue in clinical and forensic toxicology? *Anal Bioanal Chem* 388:1505–1519 . <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1267-2>
 48. International Council for Harmonisation (2018) M10: Bioanalytical Method Validation. In: Food Drug Adm. <https://www.fda.gov/media/128343/download>. Accessed 30 Sep 2019
 49. Food and Drug Administration (2018) Bioanalytical Method Validation-Guidance for Industry. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>
 50. Saar E, Gerostamoulos D, Drummer OH, Beyer J (2012) Assessment of the stability of 30 antipsychotic drugs in stored blood specimens. *Forensic Sci Int* 215:152–158 . <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.02.022>
 51. Moretti M, Freni F, Valentini B, Vignali C, Groppi A, Visonà SD, Osculati AMM, Morini L (2019) Determination of antidepressants and antipsychotics in dried blood spots (DBSs) collected from post-mortem samples and evaluation of the stability over a three-month period. *Molecules* 24:1–24 . <https://doi.org/10.3390/molecules24203636>
 52. Fisher DS, Partridge SJ, Handley SA, Flanagan RJ (2013) Stability of some atypical antipsychotics in human plasma, haemolysed whole blood, oral fluid, human serum and calf serum. *Forensic Sci Int* 229:151–156 . <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.03.021>
 53. Mbughubi M, Jannetto P, Langman L (2016) Mass spectrometry applications for toxicology. *J Int Fed Clin Chem Lab Med* 27:272–287
 54. Caramelo D, Rosado T, Oliveira V, Rodilla JM, Rocha PMM, Barroso M, Gallardo E (2019) Determination of antipsychotic drugs in oral fluid using dried saliva spots by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 411:6141–6153 . <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02005-8>

55. Patteet L, Cappelle D, Maudens KE, Crunelle CL, Sabbe B, Neels H (2015) Advances in detection of antipsychotics in biological matrices. *Clin Chim Acta* 441:11–22 . <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.12.008>
56. Smith ML, Vorce SP, Holler JM, Shimomura E, Magluilo J, Jacobs AJ, Huestis MA (2007) Modern instrumental methods in forensic toxicology. *J Anal Toxicol* 31:237–9A . <https://doi.org/10.1093/jat/31.5.237>
57. Maurer H (2006) Hyphenated mass spectrometric techniques – indispensable tools in clinical and forensic toxicology and in doping control. *J mass Spectrom* 41:1399–413 . <https://doi.org/10.1002/jms.1112>
58. Verplaetse R, Tytgat J (2011) LC-MS/MS in forensic toxicology: what about matrix effects? *TIAFT Bull* 41:8–16
59. Rosado T, Oppolzer D, Cruz B, Barroso M, Varela S, Oliveira V, Leitão C, Gallardo E (2018) Development and validation of GC/MS/MS method for simultaneous quantitation of several antipsychotics in human plasma and oral fluid. *Rapid Commun Mass Spectrom* 32:2081–2095 . <https://doi.org/10.1002/rcm.8087>
60. Mogollón N, Quiroz-moreno CD, Prata PS, Almeida JR De, Sof A, Augusto F (2018) New Advances in Toxicological Forensic Analysis Using Mass Spectrometry Techniques. *J Anal Methods Chem* 2018:1–17 . <https://doi.org/10.1155/2018/4142527>
61. Beale DJ, Pinu FR, Kouremenos KA, Poojary MM, Narayana VK, Boughton BA, Kanojia K, Dayalan S, Jones OAH, Dias DA (2018) Review of recent developments in GC–MS approaches to metabolomics-based research. *Metabolomics* 14:152 . <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1449-2>
62. Lin DL, Wang SM, Wu CH, Chen BG, Liu RH (2008) Chemical derivatization for the analysis of drugs by GC-MS - A conceptual review. *J Food Drug Anal* 16:1–10
63. Zheng N, Zeng J, Ji QC, Angeles A, Aubry A-F, Basdeo S, Buzescu A, Landry IS, Jariwala N, Turley W, Burrell R, Arnold ME (2016) Bioanalysis of dried saliva spot (DSS) samples using detergent-assisted sample extraction with UHPLC-MS/MS detection. *Anal Chim Acta* 934:170–179 . <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2016.05.057>
64. Jacques ALB, Santos MK dos, Limberger RP (2019) Development and Validation of a Method Using Dried Oral Fluid Spot to Determine Drugs of Abuse. *J Forensic Sci* 64:1–7 . <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14112>
65. Resano M, Belarra MA, García-Ruiz E, Aramendía M, Rello L (2018) Dried matrix spots and clinical elemental analysis. Current status, difficulties, and opportunities. *TrAC - Trends Anal Chem* 99:75–87 .

- <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.12.004>
66. Zimmer JS, Christianson CD, Johnson CJ, Needham SR (2013) Recent advances in the bioanalytical applications of dried matrix spotting for the analysis of drugs and their metabolites. *Bioanalysis* 5:2581–2588 . <https://doi.org/10.4155/bio.13.214>
 67. D'urso A, Cangemi G, Barco S, Striano P, D'avolio A, De Grazia U (2019) LC-MS/MS-Based Quantification of 9 Antiepileptic Drugs From a Dried Sample Spot Device. *Ther Drug Monit* 41:331–339 . <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000600>
 68. Soares S, Castro T, Rosado T, Fernández N, Barroso M, Gallardo E (2018) New analytical approach to determine organophosphorus insecticides in blood by dried matrix spots sampling and GC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 410:7955–7964 . <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1417-8>
 69. Protti M, Catapano MC, Samolsky Dekel BG, Rudge J, Gerra G, Somaini L, Mandrioli R, Mercolini L (2018) Determination of oxycodone and its major metabolites in haematic and urinary matrices: Comparison of traditional and miniaturised sampling approaches. *J Pharm Biomed Anal* 152:204–214 . <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.01.043>
 70. Jain R, Quraishi R, Verma A, Ambekar A (2019) Development and clinical evaluation of a dried urine spot method for detection of morphine among opioid users. *Indian J Pharmacol* 51:40–44 . https://doi.org/10.4103/ijp.IJP_305_18
 71. Protti M, Vignali A, Sanchez Blanco T, Rudge J, Bugamelli F, Ferranti A, Mandrioli R, Mercolini L (2018) Enantioseparation and determination of asenapine in biological fluid micromatrices by HPLC with diode array detection. *J Sep Sci* 41:1257–1265 . <https://doi.org/10.1002/jssc.201701315>
 72. Ribeiro A, Prata M, Vaz C, Rosado T, Restolho J, Barroso M, Araújo ARTS, Gallardo E (2019) Determination of methadone and EDDP in oral fluid using the dried saliva spots sampling approach and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 411:2177–2187 . <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01654-z>
 73. Merck Whatman® protein saver cards 903 Protein saver card (US), pkg of 100 ea | Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/wha10534612?lang=pt®ion=PT>. Accessed 26 Mar 2020
 74. Abdel-Rehim A, Abdel-Rehim M (2014) Dried saliva spot as a sampling technique for saliva samples. *Biomed Chromatogr* 28:875–877 . <https://doi.org/10.1002/bmc.3193>

75. Carvalho J, Rosado T, Barroso M, Gallardo E (2019) Determination of antiepileptic drugs using dried saliva spots. *J Anal Toxicol* 43:61–71 . <https://doi.org/10.1093/jat/bky064>
76. Krone CL, Oja AE, van de Groep K, Sanders EAM, Bogaert D, Trzciński K (2016) Dried saliva spots: A robust method for detecting *Streptococcus pneumoniae* carriage by PCR. *Int J Mol Sci* 17:343 . <https://doi.org/10.3390/ijms17030343>
77. Numako M, Takayama T, Noge I, Kitagawa Y, Todoroki K, Mizuno H, Min JZ, Toyo’Oka T (2016) Dried Saliva Spot (DSS) as a Convenient and Reliable Sampling for Bioanalysis: An Application for the Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Anal Chem* 88:635–639 . <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04059>
78. Antunes MV, Raymundo S, Cezimbra da Silva AC, Muller VV, Vicente Neto OJ, Schwartzmann G, Linden R (2019) Determination of Endogenous Concentrations of Uracil and Dihydrouracil in Dried Saliva Spots by LC-MS/MS. *Ther Drug Monit* 41:383–390 . <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000615>
79. Cowen PJ (1998) Psychopharmacology. In: Bellack AS, Hersen M (eds) *Comprehensive Clinical Psychology*, 1st ed. pp 135–161
80. Caramona M, Esteve A, Gonçalves J, Macedo T, Mendonça J, Osswald W, Pinheiro R, Rodrigues A, Sepodes B, Teixeira A (2013) *Prontuário terapêutico*. In: INFARMED. <https://www.ond.pt/content/uploads/2017/12/prontuario-terapeutico-2013.pdf>. Accessed 27 May 2020
81. Caldas AC, Torre C, Castelão J, Monteiro M da PL, Lopes P, Batista T, Leite A, Augusto GF, Alves I, Alves J (2019) Sem mais tempo a perder - Saúde mental em Portugal: um desafio para a próxima década. In: CNS. <http://www.cns.min-saude.pt/wp-content/uploads/2019/12/SEM-MAIS-TEMPO-A-PERDER.pdf>. Accessed 11 Mar 2020
82. Furtado C (2013) *Psicofármacos: Evolução do consumo em Portugal Continental (2000-2012)*. In: INFARMED. https://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/psicofarmacos_relatorio2013%2B%281%29.pdf/3e52568f-7f90-47c8-9903-d128395c73e5. Accessed 1 Oct 2019
83. Nemergut G, Sandra J (2019) Neuroleptics (Typical/Atypical Antipsychotics). In: Abd-Elsayed A (ed) *Pain*. pp 255–260
84. Departamento da Qualidade na Saúde (2011) *Utilização clínica de antipsicóticos*. In: Direção Geral da Saúde. <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0242011-de-29092011-jpg.aspx>. Accessed 10 Oct 2019

85. Queirós TP, Coelho FS, Linhares LA, Correia DT (2019) Esquizofrenia: O que o médico não psiquiatra precisa de saber. *Acta Med Port* 32:70–77 . <https://doi.org/10.20344/amp.10768>
86. Üçok A, Gaebel W (2008) Side effects of atypical antipsychotics: A brief overview. *World Psychiatry* 7:58–62 . <https://doi.org/10.1002/j.2051-5545.2008.tb00154.x>
87. Lally J, MacCabe JH (2015) Antipsychotic medication in schizophrenia: A review. *Br Med Bull* 114:169–179 . <https://doi.org/10.1093/bmb/ldvo17>
88. MacKenzie NE, Kowalchuk C, Agarwal SM, Costa-Dookhan KA, Caravaggio F, Gerretsen P, Chintoh A, Remington GJ, Taylor VH, Müeller DJ, Graff-Guerrero A, Hahn MK (2018) Antipsychotics, Metabolic Adverse Effects, and Cognitive Function in Schizophrenia. *Front Psychiatry* 9:622 . <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00622>
89. Carvalho Á, Xavier M, Domingos P, Almeida C, Pires P, Szabzon F (2017) Programa Nacional para a Saúde Mental. In: *Direção Geral de Saúde*. <https://www.dgs.pt/portal-da-estatistica-da-saude/diretorio-de-informacao/diretorio-de-informacao/por-serie-883589-pdf.aspx?v=%3D%3DDwAAAB%2BLCAAAAAAABAARYszItzVUy81MsTU1MDAFAHzFEfkPAAAA>. Accessed 30 Mar 2020
90. Solmi M, Murru A, Pacchiarotti I, Undurraga J, Veronese N, Fornaro M, Stubbs B, Monaco F, Vieta E, Vseeman M, Correll CU, Carvalho AF (2017) Safety, tolerability, and risks associated with first-and second-generation antipsychotics: A state-of-the-art clinical review. *Ther Clin Risk Manag* 13:757–777 . <https://doi.org/10.2147/TCRM.S117321>
91. Jann MW, Kennedy WK (2016) Antipsychotics. In: Jann MW, Penzak SR, Cohen LJ (eds) *Applied Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Psychopharmacological Agents*. pp 139–175
92. Gonçalves J (2015) *Quantificação de Antipsicóticos em Urina, recorrendo à Microextração por Sorvente Empacotado combinada com a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência*. Universidade de Coimbra
93. Costa S, Barroso M, Castañera A, Dias M (2010) Design of experiments, a powerful tool for method development in forensic toxicology: application to the optimization of urinary morphine 3-glucuronide acid hydrolysis. *Anal Bioanal Chem* 396:2533–2542 . <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3447-8>
94. Moreno I, Barroso M, Martinho A, Cruz A, Gallardo E (2015) Determination of ketamine and its major metabolite, norketamine, in urine and plasma samples using microextraction by packed sorbent and gas chromatography-tandem mass

- spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 1004:67–78 .
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.09.032>
95. Patteet L, Maudens KE, Morrens M, Sabbe B, Dom G, Neels H (2016) Determination of Common Antipsychotics in Quantisal-Collected Oral Fluid by UHPLC-MS/MS. *Ther Drug Monit* 38:87–97 .
<https://doi.org/10.1097/FTD.000000000000242>